

# **Analyse der Interaktion des GRAB Proteins von *S. pyogenes* mit**

## **$\alpha_2$ -Makroglobulin:**

### **Einfluss der Interaktion auf die Virulenz und Aufklärung der $\alpha_2$ -M**

### **Bindungsepitope in GRAB**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Antonia W. Godehardt (geb. Toppel)

aus Düsseldorf

1. Referent:	Professor Dr. K. N. Timmis
2. Referent:	Professor Dr. D. Jahn
eingereicht am:	11.09.2003
mündliche Prüfung (Disputation) am:	22.01.2004
	2004
	(Druckjahr)

## VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Professor Dr. K. N. Timmis, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## PUBLIKATIONEN

**Toppel, A.W., Rasmussen, M., Rohde, M., Medina, E., and Chhatwal, G.S.** (2003) Contribution of protein G-related  $\alpha_2$ -macroglobulin-binding protein to bacterial virulence in a mouse skin model of group A streptococcal infection. *J Infect Dis* **187**: 1694-1703.

**Medina, E., Goldmann, O., Toppel, A.W., and Chhatwal, G.S.** (2003) Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: A pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* **187**: 597-603.

**Godehardt, A.W., Hammerschmidt, S., Frank, R., and Chhatwal, G.S.** (2004) Binding of  $\alpha_2$ -macroglobulin to GRAB, an important virulence factor of group A streptococci, is mediated via two charged motifs in the  $\Delta A$  region. *Biochem J*: revised Jan 2004.

## TAGUNGSBEITRÄGE

**Toppel, A.W.:** Skin infection model to study virulence factors of streptococci. Braunschweig Streptococcal Colloquium, 2<sup>nd</sup>-5<sup>th</sup> June, 2002 (oral session).

**Toppel, A.W., Hammerschmidt, S., Frank, R., Rasmussen, M., Medina, E., and Chhatwal, G.S.:** Characterization of surface protein GRAB, a virulence factor of group A streptococci that interacts with the human protease inhibitor  $\alpha_2$ -macroglobulin. 15<sup>th</sup> Lancefield Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Goa, India, 6-11 October 2002 (poster: session P3.02).

<b>I. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>II. EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
1. Klassifizierung der Streptokokken .....	3
2. <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	4
3. Virulenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i> .....	6
4. $\alpha_2$ -Makroglobulin: Ein multifunktionaler Proteaseinhibitor .....	9
5. Interaktion von <i>S. pyogenes</i> mit $\alpha_2$ -Makroglobulin .....	11
6. Ziele der Arbeit .....	13
<b>III. ERGEBNISSE</b> .....	<b>14</b>
1. $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität klinischer Isolate von <i>S. pyogenes</i> .....	14
2. Nachweis von <i>grab</i> in klinischen Gruppe A Streptokokken .....	15
3. Analyse der Interaktion von GRAB und $\alpha_2$ -M .....	15
3.1 Lokalisation der $\alpha_2$ -M bindenden Domäne in GRAB .....	16
3.2 Klonierung, Produktion und Reinigung rekombinanter GRAB Proteine .....	17
3.3 Eingrenzung der $\alpha_2$ -M Bindungsdomäne auf $\Delta A$ in GRAB .....	18
3.4 Kompetitive Inhibition der $\alpha_2$ -M Bindung an <i>S. pyogenes</i> .....	19
3.5 Identifizierung der minimalen $\alpha_2$ -M bindenden Motive in GRAB .....	20
3.5.1 Eingrenzung der $\alpha_2$ -M Bindungsmotive durch synthetische, membrangekoppelte Peptide. ....	20
3.5.2 Identifikation der minimalen Bindungsmotive in der $\Delta A$ -Region. ....	21
3.5.3 Analyse der $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität systematisch substituierter Peptide von GRAB .....	23
3.6 Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen von R42 und R64 in rGRAB auf die Bindung von $\alpha_2$ -M .....	24
3.6.1 Mutagenese von <i>grab</i> .....	24
3.6.2 $\alpha_2$ -M-Liganden Bindungstest an substituierten rGRAB Peptiden .....	25
3.6.3 Kompetitive Inhibition der $^{125}\text{I}$ - $\alpha_2$ -M Bindung von <i>S. pyogenes</i> mit rekombinanten GRAB Proteinen .....	27
4. Nachweis von Anti-GRAB IgG in Seren GAS infizierter Patienten .....	29
5. Einfluss von Protein GRAB auf die bakterielle Virulenz .....	30
5.1 Entwicklung eines Infektionsmodells in der Maus .....	30
5.1.1 Einfluss der Mutation von <i>grab</i> auf das Wachstumsverhalten der <i>S.</i> <i>pyogenes</i> Mutante MR4 .....	30
5.1.2 Nachweis von Protein GRAB auf der bakteriellen Oberfläche von <i>S. pyogenes</i> KTL3 .....	31
5.1.3 Untersuchung der $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität in den Wachstumsphasen .....	32

5.2 <i>In vivo</i> Virulenzstudien, Vergleich von KTL3 und MR4 .....	32
5.2.1 Überlebensrate der subkutan mit <i>S. pyogenes</i> KTL3 und MR4 infizierten Mäuse .....	33
5.2.2 Analyse der bakteriellen Ausbreitung auf die Organe der Maus nach subkutaner Applikation von <i>S. pyogenes</i> KTL3 und MR4.....	33
5.2.3 Analyse der mit <i>S. pyogenes</i> KTL3 und MR4 induzierten Hautläsionen.....	34
5.2.4 Histopathologie der Hautläsionen .....	37
5.2.5 Oberflächenlokalisation von Protein GRAB in Hautsektionen GAS infizierter Mäuse .....	39
5.3 Bakterizidietest mit isolierten PMNs aus der Maus.....	40
5.3.1 Modifizierter Lancefield Assay.....	41
5.4 Immunisierung von C3H/HeN Mäusen mit rGRAB.....	42
5.4.1 Protektion der rGRAB immunisierten C3H/HeN Mäuse gegenüber <i>S. pyogenes</i> KTL3 .....	42
5.5 Analyse der $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von <i>S. pyogenes</i> KTL3 im Verlauf der systemischen Infektion .....	43
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>V. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Chemikalien, Säulenmaterial, Kits, Verbrauchsmaterial, Laborgeräte .....</b>	<b>55</b>
<b>2. Proteine, Enzyme, Antikörper .....</b>	<b>59</b>
<b>3. Puffer und Lösungen, Medien, Supplemente.....</b>	<b>61</b>
<b>4. Plasmide, Oligonukleotide .....</b>	<b>70</b>
<b>5. Bakterien .....</b>	<b>72</b>
5.1 Bakterienstämme.....	72
5.2 Kultivierung und Lagerung.....	72
5.3 Erstellung von Wachstumskurven.....	73
<b>6. Versuchstiere .....</b>	<b>73</b>
<b>7. Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>74</b>
7.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA .....	74
7.1.1 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	74
7.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i> und <i>S. pyogenes</i> .....	74
7.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose .....	74
7.1.4 Säulenaufreinigung von DNA.....	75
7.1.5 Ethanolpräzipitation von DNA.....	75
7.2 Analyse von DNA-Präparationen .....	75

7.2.1 Agarosegelelektrophorese .....	75
7.2.2 Quantifizierung von DNA .....	76
7.3 Modifizierung von DNA .....	77
7.3.1 Restriktionsanalyse .....	77
7.3.2 Dephosphorylierung .....	77
7.3.3 Entsalzung mittels Dialyse .....	77
7.3.4 Auffüllen von 5'-Überhängen .....	77
7.3.5 Ligation von DNA Fragmenten .....	78
7.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	78
7.5 Sequenzierung .....	80
7.6 Site-Directed-Mutagenesis .....	81
7.7 Southern Blot Analyse .....	82
7.8 Klonierung .....	83
7.9 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> für die Elektroporation .....	84
<b>8. Arbeiten mit Proteinen .....</b>	<b>85</b>
8.1 Induktion und Expression .....	85
8.2 Herstellung bakterieller Lysate .....	85
8.2.1 <i>E. coli</i> .....	85
8.2.2 <i>S. pyogenes</i> .....	85
8.2.3 French Press .....	85
8.3 Affinitätschromatographie .....	86
8.3.1 Aufreinigung von His-Tag Proteinen .....	86
8.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	86
8.3.3 IgG Aufreinigung mittels Protein A .....	86
8.3.4 Kopplung von Proteinen an aktivierte CNBr-Sepharose .....	87
8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	88
8.4.1 Immunblot .....	88
8.4.2 Ligandenassay .....	89
8.4.3 Analyse Membran synthetisierter Peptide .....	89
8.5 Quantifizierung von Proteinen .....	90
<b>9. Bindungstests mit löslichen Proteinen .....</b>	<b>90</b>
9.1 Radioaktive Markierung von Proteinen mit <sup>125</sup> Iod .....	90
9.2 Bindungsversuche mit <i>S. pyogenes</i> .....	91
9.3 Inhibitionsversuche .....	92
<b>10. Immunologische Methoden .....</b>	<b>92</b>
10.1 Immunisierung .....	92
10.1.1 Herstellung polyklonaler anti-GRAB Antikörper .....	92

10.1.2 Immunisierung von Mäusen.....	92
10.1.3 Serumgewinnung aus Blut.....	93
10.2 ELISA .....	93
10.3 FACS Analyse .....	93
10.4 Phagozytose Assays.....	94
10.4.1 Isolierung intraperitonealer Makrophagen aus der Maus .....	94
10.4.2 Anreicherung und Isolierung von PMNs aus der Maus .....	94
10.4.3 Bakterizidietest.....	94
10.4.4 Modifizierter Lancefield-Assay .....	95
<b>11. Maus-Infektionsmodell .....</b>	<b>95</b>
11.1 Infektion von Mäusen mit <i>S. pyogenes</i> .....	95
11.1.1 Einstellung und Kontrolle des Inokulums .....	96
11.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl in den Organen .....	96
11.3 Isolierung und Charakterisierung von Phagozyten aus der Haut GAS infizierter Mäuse.....	97
11.4 Reisolierung von Bakterien aus der Maus .....	97
<b>12. Mikroskopie .....</b>	<b>97</b>
12.1 Histologie.....	97
12.1.1 Fixierung und Einbettung der Präparate.....	97
12.1.2 Azur-Eosin Färbung .....	98
12.1.3 Immunfluoreszenz.....	98
12.2 Elektronenmikroskopie.....	98
12.2.1 Lokalisation bakterieller Oberflächenproteine .....	99
<b>13. Statistische Analyse .....</b>	<b>100</b>
 <b>VI. LITERATUR.....</b>	 <b>101</b>
 <b>VII. ANHANG .....</b>	 <b>120</b>
1. Übersicht der klinischen GAS Isolate.....	120
2. Peptidsequenzen, densitometrische Analyse .....	122
3. Abkürzungsverzeichnis .....	126
 <b>VIII. DANKSAGUNG.....</b>	 <b>128</b>

## I. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von *S. pyogenes* mit dem menschlichen Plasma-Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ -M) untersucht. Das  $\alpha_2$ -M-bindende Protein GRAB von *S. pyogenes* vermittelt die Interaktion in 23 % der klinischen Stämme, von denen 80 % aus Hautinfektionen und 20 % aus Racheninfekten isoliert wurden. Die Analyse der Interaktion des bakteriellen Oberflächenproteins GRAB mit dem Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -M mittels Peptidarray-Technologie identifizierte zwei Bindungsmotive in der  $\Delta A$ -Region von GRAB. Die  $\Delta A$ -Region umfasst die Aminosäuren 34 bis 67 des GRAB Proteins (Referenzstamm SF370) und ist innerhalb der Gruppe A Streptokokken (GAS) hoch konserviert. Diese  $\alpha_2$ -M-Bindungsdomäne weist eine 72 %ige Homologie zu der  $\alpha_2$ -M bindenden Domäne des Protein G von Gruppe C und G Streptokokken auf. Die Untersuchungen zur Eingrenzung der Bindungsmotive identifizierten die Aminosäuresequenzen **PR**<sup>42</sup>IIPNGGTL und NAPEKLAL**R**<sup>64</sup>N als minimale Bindungspeptide. Die essentielle Funktion der Arginine an Position 42 und 64 für die GRAB- $\alpha_2$ -M-Interaktion konnte durch systematische Aminosäureaustausche in den Motiven nachgewiesen werden. Eine Insertion von Punktmutationen in *grab*, die zu einem Austausch von Arg<sup>42</sup>, Arg<sup>64</sup> bzw. Arg<sup>42/64</sup> gegen die Aminosäure Glycin führte, bestätigte die kritische Funktion der Arginine in dieser Protein-Protein-Interaktion.

Da es sich bei GRAB um das einzige  $\alpha_2$ -M bindende Protein von *S. pyogenes* handelt und Seren GAS infizierter Patienten anti-GRAB gerichtete Antikörper (anti-GRAB IgG) enthielten, wurde der Einfluss von Protein GRAB auf den Infektionsprozess untersucht. In einem Hautinfektionsmodell mit C3H/HeN und BALB/c Mäusen wurde das  $\alpha_2$ -M bindende *S. pyogenes* Isolat KTL3 mit einer aus KTL3 generierten isogenen *grab*-Mutante (MR4) verglichen. Subkutan mit MR4 infizierte Mäuse überlebten länger, entwickelten kleinere Hautläsionen und wiesen eine geringere bakterielle Belastung der Organe auf. Diese *in vivo* Infektionen bestätigten Protein GRAB als Virulenzfaktor. In Immunisierungsstudien mit C3H/HeN Mäusen wurde das Potenzial von GRAB als Vakzin gegen *S. pyogenes* getestet. Trotz einer positiven Immunantwort gegen das verabreichte Antigen konnte die Überlebensrate der mit rGRAB immunisierten Tiere nicht gesteigert werden. Eine Analyse der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität ergab, dass systemische Bakterien ihre Bindungsaktivität verloren hatten. Aus der Haut isolierte Erreger waren weiterhin in der Lage  $\alpha_2$ -M zu binden. Das unterschiedliche Bindungsverhalten wies auf eine strikte Regulation von Protein GRAB



während der Infektion hin und begrenzt einen Einsatz von GRAB als Vakzin. Die bevorzugte Expression von GRAB durch *S. pyogenes* Hautisolate sowie die Aufklärung der  $\alpha_2$ -M Bindungs epitope bieten jedoch eine attraktive Möglichkeit für den therapeutischen Einsatz hoch affiner, synthetischer Peptide z.B. bei *S. pyogenes* verursachten Hautinfektionen.

## II. Einleitung

### 1. Klassifizierung der Streptokokken

Die Familie der Streptococcaceae besteht aus oxidase- und katalase-negativen, fakultativ anaeroben, grampositiven Kokken. Sie wird in sieben Gattungen unterteilt, von denen die Gattungen *Enterococcus* und *Streptococcus* für die medizinische Mikrobiologie von Bedeutung sind. Die Entdeckung der Streptokokken erfolgte 1874 durch Billroth, der den Erreger in Präparaten von Wundeiterungen beobachtete. Aufgrund ihrer Fähigkeit eitrige Infektionen hervorzurufen wurden sie von Rosenbach im Jahr 1884 erstmalig als *Streptococcus pyogenes* bezeichnet.

Die Klassifizierung der Streptokokken basiert auf den Arbeiten von Schottmüller (1903) und Brown (1919), welche die Bakterien aufgrund ihrer Fähigkeit rote Blutkörperchen zu lysieren in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hämolytische Streptokokken unterteilten (s.u.). Eine eindeutige Typisierung der  $\beta$ -hämolytischen Streptokokken wurde durch die Arbeiten von Rebecca C. Lancefield in den frühen 30er Jahren ermöglicht. Die Lancefield Gruppierung der Streptokokken beruht dabei auf der unterschiedlichen Antigenität der sog. C-Substanz (Lancefield, 1933, 1928, 1928). Bei der C-Substanz handelt es sich um ein zellwandgekoppeltes Polysaccharid bzw. eine bei Serogruppe D vorkommenden Lipoteichonsäure. Sie ist insbesondere für die  $\beta$ -hämolytischen Streptokokken speziesspezifisch und wird als Gruppenpolysaccharid bezeichnet. Die C-Substanz ist in hohen Konzentrationen in der bakteriellen Zellwand enthalten und bildet in Verbindung mit Peptidoglycan die für Streptokokken typische, sehr feste Zellwandstruktur aus. Basierend auf der unterschiedlichen Antigenität des Zellwandpolysaccharids werden die Streptokokken in die serologischen Gruppen A bis V eingeteilt (Krause, 2002; Kayser *et al.*, 1998; Brandis *et al.*, 1994).

$\alpha$ -Hämolyse: unvollständige Hämolyse (grüne Höfe um die Kolonien herum), Erythrozytenmembran ist weitgehend intakt, Blutfarbstoff wird zu Methämoglobin umgewandelt

$\beta$ -Hämolyse: vollständige Hämolyse, die auf der Wirkung von Streptolysin S und Streptolysin O beruht (Kolonien sind von einer durchsichtigen, scharf begrenzten Zone umgeben), die Erythrozyten sind aufgelöst, der Blutfarbstoff ist abgebaut

$\gamma$ -Hämolyse: nicht hämolysierend

## 2. *Streptococcus pyogenes*

Bei den Gruppe A Streptokokken handelt es sich um grampositive Kokken, die in gewundenen Ketten wachsen und durch eine ausgeprägte  $\beta$ -Hämolysen auf Blutagar gekennzeichnet sind. Die Gruppe A besteht ausschließlich aus humanpathogenen Organismen mit *Streptococcus pyogenes* als Typspezies und stellt die Hauptursache für Streptokokkeninfektionen beim Menschen dar (Abb.

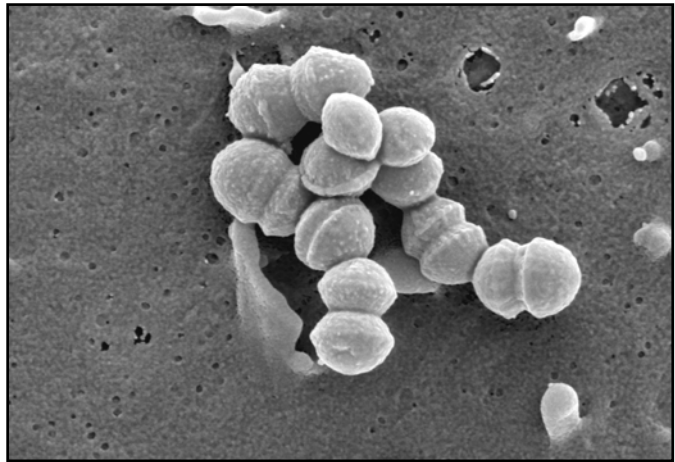


Abb. 1: FESEM von *S. pyogenes* KTL3

1; 2). Bis auf gelegentliche Ausnahmen von oralen Streptokokken aus der *S. milleri* Gruppe, ist *S. pyogenes* der einzige Vertreter der GAS (Brandis *et al.*, 1994).

Durch *S. pyogenes* verursachte Infektionen sind sowohl in Industrieländern, als auch in Entwicklungsländern weit verbreitet. Die Erscheinungsformen reichen von einer unbemerkten, symptomlosen Kolonisierung der Schleimhäute, über Infektionen des oberen Respirationstraktes, in Form von Tonsillopharyngitis bis hin zu Pyodermien wie der Impetigo contagiosa. Die seltener auftretenden schwerwiegenden Erscheinungsformen sind phlegmonöse Entzündungen der tiefer gelegenen Gewebeschichten wie der Subkutis oder dem Faszienbereich. Diese sind häufig mit einem großflächigen Gewebeerfall bis in den Muskel hinein verbunden (Stevens, 1995; Novak, 1994; Stevens, 1992). Insbesondere die Bindegewebsinfektionen sowie die unbehandelten Racheninfekte bergen das Risiko einer Sepsis bzw. eines toxischen Schocks (streptococcal toxic shock-like syndrom, STSS) (Stevens *et al.*, 1989; Bisno *et al.*, 1996; Stevens, 1995). Neben diesen schweren Krankheitsverläufen ziehen zudem Folgeerkrankungen aus unzureichend behandelten Primärinfektionen in Form von Rheumatischem Fieber (RF) und rheumatischen Schädigungen der Herzklappen (ARF) kostenaufwendige, langfristige Behandlungen nach sich und stellen in Ländern mit geringer medizinischer Versorgung ein akutes Problem in weiten Teilen der Bevölkerung dar (Cunningham, 2000). Allein in Indien sind Pharyngitis, rheumatisches Fieber und die damit verbundene Schädigung der Herzklappen die Hauptursache für Erkrankungen und Todesfälle von Kindern im Alter zwischen 5-15 Jahren (Bisno, 2001; Cunningham, 2000). Weltweit wurden im Jahr 2001 insgesamt 11.000 Fälle invasiver GAS Erkrankungen dokumentiert

(3,5 Fälle / 100.000 Personen). In 6 % der Fälle handelte es sich um STSS und in 7 % um nekrotisierende Fasciitis (NF). Die Zahl der dokumentierten, nicht invasiven GAS-Infektionen lag bei über 10.000.000. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Rachen- und Hautinfektionen (Press Release CDC/ March 2003).

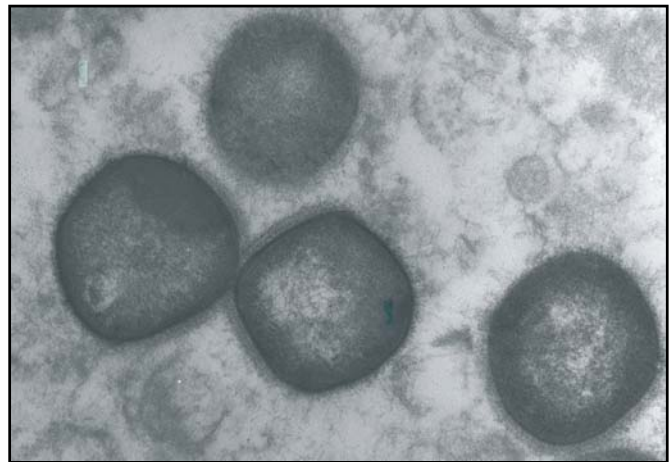
Bis heute wird die Behandlung von *S. pyogenes* Infektionen mit  $\beta$ -Lactamen wie z. B. Penicillin G, Cephalosporin oder Makroliden wie dem Erythromycin als ausreichend angesehen (Horn *et al.*, 1998). Trotz ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten hat diese Form der Therapie Grenzen. Infolge der freien Verfügbarkeit der Medikamente in vielen Ländern und einer mangelnden medizinischen Beratung werden viele Medikationen frühzeitig unterbrochen oder in unregelmäßigen Abständen verabreicht. Ihre Wirkung wird damit begrenzt oder bleibt vollständig aus. Zum anderen sind schnell fortschreitende invasive Erkrankungen wie NF oder STSS nur bedingt mit Antibiotika therapierbar und erfordern direkte Maßnahmen. Dazu gehören die Sektionen des betroffenen Gewebes bei der NF oder im Fall von bakterieller Sepsis oder STSS die Vergabe von Flüssigkeit, Vasorepressoren und Antibiotika wie z.B. Clindamycin (Van Amersfoort *et al.*, 2003; Zimbelman *et al.*, 1999; Sriskandan *et al.*, 1997). Trotz der vielversprechenden Versuche mit neutralisierenden Antikörpern und Antigenspezifischen Peptiden gibt es bis heute noch keine Methode mit der Sepsis- bzw. STSS Patienten sicher und erfolgreich behandelt werden können (Arad *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2000; Norrby-Teglund *et al.*, 2000; Kaul *et al.*, 1999). Die Sterblichkeitsrate von STSS Patienten liegt noch immer über 50 % (Press Release CDC/ June 2003).

Das Auftreten erster Resistenzen gegen Erythromycin und Clindamycin seit 1955 sowie die überraschende Rückkehr insbesondere invasiver Epidemien Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre in England (Bisno *et al.*, 1996), Ausbrüche von rheumatischem Fieber in den USA (Bisno, 1991; Kaplan, 1991; Veasy *et al.*, 1987) sowie das vermehrte Auftreten des STSS in den letzten Jahren (Stevens, 2000; 1999; Demers *et al.*, 1993) deuten einen Wechsel der bisherige Rolle von *S. pyogenes* als Pathogen an. Die Ursache für diese Entwicklung ist bislang noch unklar. Einerseits werden neu aufgetretene hochvirulente GAS Stämme als Auslöser vermutet (Johnson *et al.*, 2002; Musser *et al.*, 1995), andererseits auch genetische und physiologische Prädispositionen des Wirtes als mögliche Erklärung diskutiert (Kotb *et al.*, 2002; Kaul *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1996). Aus diesem Grund besteht, trotz derzeit guter Therapiemöglichkeiten, eine verstärkte Notwendigkeit neue Wege der Behandlung und Prophylaxe zu etablieren, wobei das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung eines Impfstoffes liegt. Das antiphagozytische M-Protein von *S. pyogenes* wurde lange Zeit aufgrund seiner

Fähigkeit eine protektive Immunantwort zu vermitteln, als potenzieller Kandidat betrachtet. Die hohe Heterogenität innerhalb der GAS mit mittlerweile über hundert verschiedenen M-Serotypen (Facklam *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2000), sowie das Auftreten von Kreuzreaktionen M-Protein spezifischer Antikörper mit wirtseigenem Myosin erschweren jedoch einen Einsatz als Vakzin (Cunningham, 2000; Cunningham *et al.*, 1997). Es ist daher von besonderem Interesse weitere bakterielle Faktoren, welche eine Interaktion mit Wirtskomponenten vermitteln und somit an der Etablierung des Erregers beteiligt sind, aufzuklären und ihre Eignung als mögliche Impfstoffkandidaten zu testen.

### 3. Virulenzfaktoren von *S. pyogenes*

*S. pyogenes* ist ein extrazellulärer Erreger und besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher Virulenzfaktoren. Diese ermöglichen die Kolonisierung des Wirtes, verhindern eine Erkennung durch die Immunabwehr oder führen zu einer Modulation der gegen das Bakterium gerichteten Immunantwort.



**Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. pyogenes* KTL3**

Bei den bakteriellen Virulenzfaktoren werden extrazelluläre und zellwandassoziierte Faktoren unterschieden (Navarre *et al.* 1999). Das wichtigste Oberflächenprotein und gleichzeitig Hauptvirulenzfaktor von *S. pyogenes* ist das antiphagozytische M-Protein (Lancefield, 1962). Das M-Protein ist aus vier unterschiedlichen sich wiederholenden Regionen aufgebaut. Diese bestehen aus den hypervariablen N-terminalen A-Repeats, den zentral gelegenen B- und C-Repeats und den konservierten C-terminal gelegenen D-Repeats. Die Größe der jeweiligen Abschnitte ist variabel (Fischetti, 1989; Fischetti *et al.*, 1988). Das nach außen gerichtete, hypervariable N-terminale Ende führt bei Infektion mit dem Erreger zu einer typenspezifischen Immunität auf deren Basis bislang über 100 verschiedene Serotypen von *S. pyogenes* unterschieden werden (Facklam *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2000). Durch seine antiphagozytische Wirkung ermöglicht das M-Protein dem Erreger das Wachstum in menschlichem Blut. Dies beruht hauptsächlich auf der Interaktion des M-Proteins mit IgG, Faktor H, FHL-1 und C4BP (Johnsson *et al.*, 1998; Schräger *et al.*, 1998; Berge *et al.*, 1997;

Thern *et al.*, 1995; Horstmann *et al.*, 1988). Durch die Interaktionen wird die Aktivierung des alternativen Komplementweges verlangsamt und die antikörperunabhängige Phagozytose des Erregers vermindert (Horstmann *et al.*, 1992; 1988). Des weiteren dient das M-Protein als Adhäsion. Durch die Bindung von Albumin, Fibrinogen und Fibronectin wird die Adhärenz an die Wirtsepithelien vermittelt und eine Kolonisierung erleichtert (Okada *et al.*, 1995; 1994; Courtney *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1990). Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind die bakteriellen Adhäsine. Durch sie ist der Erreger in der Lage an das Epithelium bzw. Komponenten der extrazellulären Matrix zu Adhären und sich im Wirtsgewebe zu etablieren. Bislang werden elf verschiedene Adhäsine unterschieden (Cunningham, 2000; Hasty *et al.*, 1996). Zu diesen zählen neben dem M-Protein die Fibronectin bindenden Proteine wie SfbI/Protein F, FBP54, ein 29 kDa großes Fibronectin bindendes Protein, SOF (Serum Opacity Factor, auch als SfbII bezeichnet), eine Glyceraldehyd-3-phosphate Dehydrogenase, LTA (Lipoteichonsäure) und die Hyaluronsäurekapsel. Weitere Adhäsine sind das Kollagen- und Vitronectin- und ein 70 kDa großes Galaktose-bindende Protein (Referenzen siehe Cunningham, 2000).

Neben den bakteriellen Adhäsinen tragen Faktoren wie die Plasmin(ogen) bindenden Proteine SDH (Pancholi *et al.*, 1993; Broder *et al.*, 1991),  $\alpha$ -Enolase (Pancholi *et al.*, 1998; 1997), PAM (Berge *et al.*, 1993) und M-Protein gebundenes Fibrin (Wang *et al.* 1995) sowie die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Plr (Winram *et al.*, 1998; Lottenberg *et al.*, 1992) zur Ausbreitung des Erregers im Gewebe durch Fibrinolyse bei (Eberhardt *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; D'Costa *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1995; Lähteenmäki *et al.*, 1995; Lottenberg *et al.*, 1994;). Faktoren wie die C5a Peptidase verlangsamen dagegen durch die Spaltung von Faktor C5a den Ablauf der Komplementkaskade und verhindern somit die Ausbildung des MAC Komplexes (Cleary *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1990; Wexler *et al.*, 1985).

Zu den extrazellulären sekretierten Faktoren der GAS gehört die Gruppe der Zytolysine. Zwei wichtige Vertreter dieser Gruppe sind das Streptolysin S (SLS) und das sauerstoffempfindliche Streptolysin O (SLO). Streptolysin S ist ein nicht immunogenes Zytolysin, das zur Auflösung der Erythrozytenmembranen und anderer eukaryotischer Zellen beiträgt. Des Weiteren führt SLS nach Phagozytose des Erregers zur Freisetzung der lysosomalen Inhaltstoffe und ist somit an der Zerstörung professioneller Phagozyten beteiligt (Betschel *et al.*, 1998). Das immunogene Hämolysin SLO wirkt ebenfalls zytotoxisch auf eukaryotische Zellen und unterstützt ebenfalls die Ausbreitung des Erregers im Gewebe. Eine weitere wichtige Gruppe von Virulenzfaktoren sind die, auch als Superantigene bezeichneten pyrogenen Streptokokken Exotoxine (SPE). Bislang konnten acht verschiedene Exotoxine

von *S. pyogenes* identifiziert werden (SpeA, -B, -C, -D, -F, -G, -H, -J). Die bakteriellen Exotoxine verursachen einerseits den für Scharlach typischen Hautausschlag und sind andererseits durch ihren starken Effekt auf das Immunsystem an der Entwicklung des toxischen Schock Syndroms beteiligt (Referenzen siehe Cunningham, 2000). Weitere extrazelluläre Faktoren sind die bakteriellen DNasen. Sie spalten DNA in Abszessen, führen zu einer Verringerung der Viskosität und erleichtern dem Erreger die Ausbreitung im Gewebe (Broudy *et al.*, 2002; Wannamaker, 1958). Das von manchen Streptokokken sekretierte Protein SIC (streptococcal inhibitor of complement mediated lysis) verlangsamt dagegen, ähnlich wie die C5a Peptidase, durch Interaktion mit chemotaktischen Komponenten des Komplement Systems die Ausbildung des MAC Komplexes (Frick *et al.*, 2003; Fernie-King *et al.*, 2001; Lukomski *et al.*, 2000; Åkesson *et al.*, 1996).

Für die Etablierung des Erregers in tiefer gelegenen Gewebeschichten spielen proteolytische Prozesse eine wichtige Rolle. Die Sekretion von Proteasen führt zur Degradation von Matrixproteinen und Immunglobulinen, beeinflusst den Ablauf der Komplementkaskade und vermittelt die Aktivierung wirtseigener Proteasen. Durch die gewebespezifische Freisetzung von Proteasen sind Gruppe A Streptokokken aktiv an der Entwicklung und Modulation inflammatorischer Prozesse beteiligt. Eine der am besten untersuchten bakteriellen Proteasen ist die Cysteinprotease SpeB (Collin *et al.*, 2000, Elliott, 1945). SpeB ist in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden zu spalten. Zu diesen gehören Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibrin, Fibrinogen, Vitronektin, Matrix Proteoglycane (Schmidtchen *et al.*, 2001; Kapur *et al.*, 1993; 1993) sowie opsonisierende Immunglobuline (Collin *et al.* 2001). Zudem bewirkt SpeB die Aktivierung von wirtsspezifischen Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Burns *et al.*, 1996) Die Aktivierung dieser Zymogene führt zu einem massiven Abbau der extrazellulären Matrix und des umgebenden Gewebes und erleichtert dem Erreger die Ausbreitung. Gleichzeitig werden durch die spezifische Spaltung von IgG oder den C-terminalen Abbau von, IgA, IgM und IgD die Phagozytose durch invadierende Granulozyten verringert (Collin *et al.*, 2003; 2002; 2001). Auf der anderen Seite führt die Sekretion von SpeB, zur Spaltung von Kininogen, durch das inflammatorische Mediatoren wie das Bradikinin (Herwald *et al.*, 1996) und IL-1 $\beta$  (Kapur *et al.*, 1993) freigesetzt werden. Diese Mediatoren lösen inflammatorische Prozesse aus, die zu der Einwanderung phagozytischer neutrophiler Granulozyten führen, die den gewebespezifischen Abbau verstärken (Smith, 1994; Weiss 1989).

Die massive Freisetzung von proteolytischen Enzymen durch *S. pyogenes* als auch durch den Wirt erfordern Schutzmechanismen, durch den bakterielle Oberflächenstrukturen wie z.B. das

M-Protein vor unspezifischem Abbau bewahrt werden (Rasmussen *et al.*, 2002). Da GAS keinen für diesen Zweck geeigneten Mechanismus besitzen erfolgt die Inhibition durch Rekrutierung wirtseigener Proteaseinhibitoren. Zu diesen gehört, neben der M-Protein vermittelten Interaktion mit Kininogen, einem Cysteinproteaseinhibitor (Ben Nasr *et al.*, 1995), die Rekrutierung des multifunktionellen Plasmaprotease Inhibitors  $\alpha_2$ -Makroglobulin durch das bakterielle Oberflächenprotein GRAB (Rasmussen *et al.*, 1999).

#### 4. $\alpha_2$ -Makroglobulin: Ein multifunktionaler Proteaseinhibitor

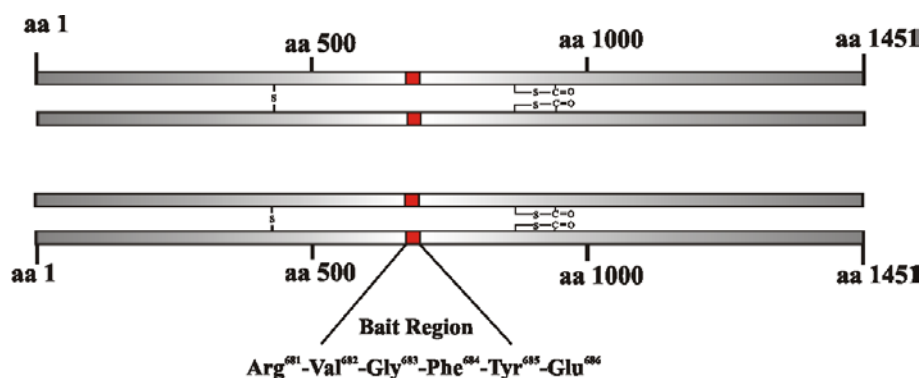
$\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ -M) ist ein ca. 725 kDa großer, multifunktionaler Protease- Inhibitor, der im menschlichen Plasma in Konzentrationen von 1,5-3,5 mg/ml vorkommt (Justus *et al.*, 1990; Coan, 1989). Das Protein kann nahezu alle Klassen von Endopeptidasen wie die Serin-, Cystein-, Asparagin- spezifische Proteasen sowie die Metallo-Typ Proteasen inhibieren (Sottrup-Jensen *et al.*, 1984; Barrett *et al.*, 1973).  $\alpha_2$ -M besteht aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Paaren identischer Untereinheiten die durch Disulfidbrücken gekoppelt sind. Jede Untereinheit trägt eine für Proteasen spezifische, als „bait-region“ bezeichnete Aminosäuresequenz. Die Restriktion dieser Region durch Proteasen führt zur Spaltung eines internen Thioesters ( $\beta$ -Cysteinyl- $\gamma$ -Glutamyl Thioester). Die Glutamylgruppe des Thioesters bildet eine Aminobindung mit den Lysinresten der entsprechenden Protease aus und bindet diese kovalent. Der Vorgang ist mit einer Konformationsänderung des Inhibitors verbunden durch den die nach wie vor aktive Protease im innern des Inhibitors eingeschlossen wird (Abb. 3). Vorhergehende Studien zeigen, dass gebundene Proteasen ihre Aktivität gegenüber kleineren Substraten behalten, während die Umsetzung größerer Substrate sterisch blockiert wird (Sottrup-Jensen, 1989; Feldmann *et al.*, 1985; Sottrup-Jensen *et al.*, 1981). Die Komplexbildung erfolgt in einem Verhältnis von 2:1 (Protease : Inhibitor) (Howell *et al.*, 1983; Sottrup-Jensen *et al.*, 1981) und geht mit der Präsentation einer bis dahin unzugänglichen LRP (low-density-lipoprotein-receptor related protein)-Rezeptor-Bindungstelle einher. Das Protease-komplexierte  $\alpha_2$ -M wird innerhalb von Minuten über LRP-Rezeptor vermittelte Phagozytose aus dem Blutstrom entfernt (Hussain *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1994; 1992). Zu den LRP-Rezeptor präsentierenden Zellen gehören neben den antigenpräsentierenden Makrophagen sowohl Hepatozyten als auch Fibroblasten (Feldmann *et al.*, 1985; Imber *et al.*, 1981; Debane *et al.*, 1976; 1975).

Neben der ausführlich charakterisierten Funktion als Proteaseinhibitor ist  $\alpha_2$ -M ferner in der Lage mit einer Vielzahl von anderen Faktoren zu interagieren (Armstrong *et al.*, 1999). Dazu



gehören die Stimulation der Immunantwort, durch die LRP-Rezeptor vermittelte Phagozytose fremder, exogener mit  $\alpha_2$ -M-komplexierter Proteasen durch Antigen präsentierende Zellen (Straight *et al.*, 1988), als auch die konformationsabhängigen Interaktionen mit Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 und IL-10 (Garber *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 1989), sowie Wachstumsfaktoren wie PDGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  oder NGF- $\beta$  (Mettenburg *et al.*, 2002; Bhattacharjee *et al.*, 2000; Gonias *et al.*, 2000; Borth *et al.*, 1989). Des Weiteren können kleinere Substrate wie der T-Zell Wachstumsfaktor IL-2 von den in  $\alpha_2$ -M eingeschlossenen Proteasen abgebaut und die Proliferation der T-Zellen beeinflusst werden (Borth, 1994; Petersen *et al.*, 1989; Borth *et al.*, 1986).

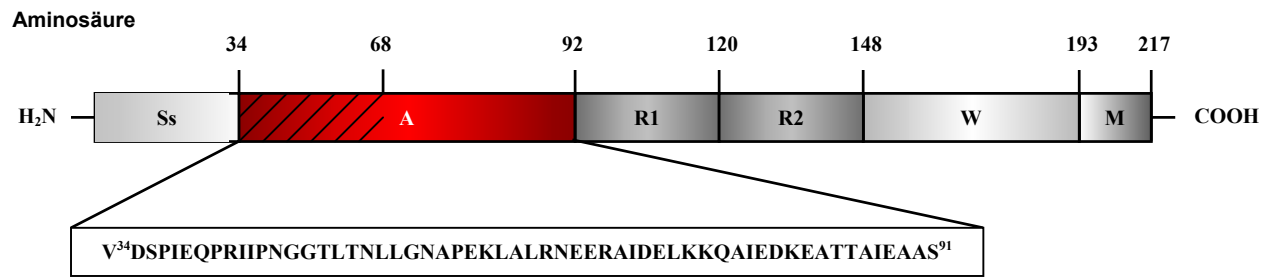
Die Fähigkeit von  $\alpha_2$ -M sowohl mit Proteasen aller vier Klassen zu interagieren (unabhängig ob endo- oder exogenen Ursprungs), wenn auch mit einer geringeren Effizienz als die spezifischen Proteaseinhibitoren, sowie die hohe Konzentration in menschlichem Plasma deuten darauf hin, dass es sich um einen Kontrollmechanismus handelt, der die Konzentration von löslichen Plasmaproteasen auf ein physiologisches Niveau beschränkt. Es kann sich aber ebenso um einen ursprünglichen Schutzmechanismus gegen eindringende Pathogene bzw. deren Proteasen handeln (Travis *et al.*, 1983). Die Vielschichtigkeit dieser Wechselwirkungen, ihr Einfluss auf die menschliche Physiologie und somit auf den Infektionsprozess sind bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass Bakterien wie *S. pyogenes* in der Lage sind den multifunktionellen Plasmaproteaseinhibitor (entgegen seiner eigentlichen Funktion) zu binden und zum Schutz eigener Oberflächenstrukturen einzusetzen (Rasmussen *et al.*, 1999). Die Auswirkung dieser Interaktion auf die bakterielle Virulenz ist bislang unbekannt.



**Abb. 3: Strukturmodell von  $\alpha_2$ -Makroglobulin.** Das tetramere Plasmaprotein  $\alpha_2$ -M besteht aus zwei identischen Homodimeren. Die als Bait Region bezeichnete Protease-Spaltstelle wurde rot unterlegt. Die reaktiven Thioester Gruppen (Cys<sup>949</sup>-Gly<sup>950</sup>-Glu<sup>951</sup>-Glx<sup>952</sup>) wurden N-terminal der Bait Region dargestellt.

## 5. Interaktion von *S. pyogenes* mit $\alpha_2$ -Makroglobulin

In vorhergehenden Studien wurden fünf verschiedene  $\alpha_2$ -M Bindungsproteine der Streptokokken identifiziert. Zu diesen zählen die Gruppe C Streptokokken Proteine ZAG aus *S. zooepidemicus* (Jonsson *et al.*, 1995), MAG (Jonsson *et al.*, 1995; 1994) und MIG (Song *et al.*, 2001; Vasi *et al.*, 1999; Jonsson *et al.*, 1994) aus *S. dysgalactiae* sowie Protein G aus humanpathogenen Gruppe G und C Streptokokken (Müller *et al.*, 1995; Sjöbring *et al.*, 1991; 1989; Chhatwal *et al.*, 1983). Protein GRAB ist neben einem 78 kDa großen, jedoch nicht näher identifizierten Protein (Chhatwal *et al.*, 1987) das einzige auf molekularer Basis charakterisierte  $\alpha_2$ -M Bindungsprotein der Gruppe A Streptokokken (Rasmussen *et al.*, 1999). Die Rekrutierung von  $\alpha_2$ -M erfolgt auf zwei Arten. Die Proteine MIG, MAG und ZAG interagieren ausschließlich mit Protease-komplexiertem  $\alpha_2$ -M. Aufgrund seiner Wanderungseigenschaften in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird dieses auch als „fast-form“  $\alpha_2$ -M bezeichnet (Petersen *et al.*, 1989). Protein G und GRAB binden das Protease-freie „slow-Form“  $\alpha_2$ -M über einen nahezu identischen Mechanismus. Weder Protein G noch Protein GRAB besitzen proteolytische Eigenschaften, die zu einem vollständigen Konformationswechsel des Inhibitors führen (Rasmussen *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1995). Das gebundene  $\alpha_2$ -M bleibt aktiv. Die Identifizierung von Protein GRAB erfolgte durch Sequenzhomologien der N-terminalen A-Domäne von GRAB zu Protein G. GRAB ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 22,8 kDa. Es besteht aus einem für grampositive Bakterien typischen LPXTG-Motiv als Transmembrananker (Janulczyk *et al.*, 2001; Navarre *et al.*, 1999), einer variablen Anzahl 28 Aminosäuren langer Wiederholungssequenzen und der hoch konservierten  $\alpha_2$ -M Bindungsdomäne in Region A. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Funktion von GRAB darin besteht, die Proteolyse von Oberflächenproteinen durch fremde als auch bakterielle Proteasen wie der SpeB zu regulieren. Durch die Bindung von  $\alpha_2$ -M an GRAB kann der frühzeitige Abbau exponierter Oberflächenstrukturen wie z.B. dem antiphagozytischen M-Protein verhindert und somit möglicherweise die Überlebensfähigkeit der Bakterien in einem proteasereichen Milieu erhöht werden (Rasmussen *et al.*, 1999).



**Abb. 4: Modell von Protein GRAB aus *S. pyogenes* SF370.** (Ss) bezeichnet die Signal Sequenz. Die  $\alpha_2$ -M bindende Domäne (A) von Protein GRAB ist in rot und Bereiche mit Homologie zu Protein G (As 34-67) schattiert dargestellt. (R1, R2) weist auf die 28 Aminosäure langen Wiederholungssequenzen hin. Domäne (W) stellt die Zellwand durchspannende Region und (M) den Membrananker dar.

## 6. Ziele der Arbeit

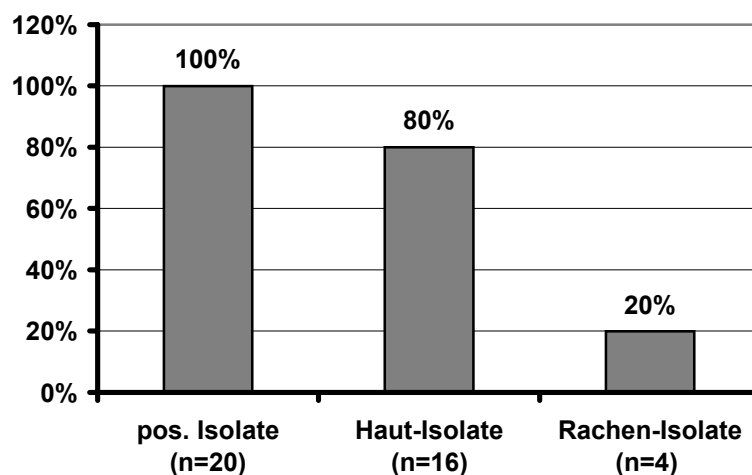
Der menschliche Plasma-Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -M wird über das bakterielle Oberflächenprotein GRAB gebunden (Rasmussen *et al.*, 1999). Ziele dieser Arbeit waren die Identifizierung der  $\alpha_2$ -M Bindungsmotive von GRAB und der für die Bindung essentiellen Aminosäuren. Die Prävalenz von GRAB innerhalb der GAS sollte bestimmt und mit den klinischen Informationen der untersuchten Isolate verglichen werden. In *in vivo* Virulenzstudien sollte der Einfluss von Protein GRAB auf den Infektionsprozess untersucht und seine Eignung als potenzielles Vakzin getestet werden.

### III. Ergebnisse

#### 1. $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität klinischer Isolate von *S. pyogenes*

In diesem Versuch wurden 86 verschiedene klinische GAS Isolate (VII 1.) aus unterschiedlichen Gebieten Deutschlands und Australiens hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet,  $^{125}\text{I}$ -markiertes, gelöstes  $\alpha_2$ -M zu binden. Als positiv bindende Isolate wurden ausschließlich solche Stämme bezeichnet, deren relative Bindungsaktivität über 10 % (entspricht ca. 1 ng  $\alpha_2$ -M) der ursprünglich eingesetzten Aktivität lag (siehe V 9.2). Die Isolate stammten von Patienten, welche entweder an Rachen- (n = 40) oder an Hautinfektionen (n = 46) erkrankt waren. Das Ziel der Untersuchung bestand darin, sowohl die Anzahl der  $\alpha_2$ -M bindenden Isolate, als auch mögliche Zusammenhänge hinsichtlich der Bindungsaktivität und Herkunft festzustellen.

Es konnte gezeigt werden, dass 20 (23 %) der insgesamt 86 Isolate gelöstes  $\alpha_2$ -M mit einer Effizienz zwischen 10-70 % zu binden konnten, während 66 Isolate (77 %) nicht mit  $^{125}\text{I}$ - $\alpha_2$ -M reagierten. Von den positiv getesteten Stämmen stammten 16 (80 %) aus Pyodermien und 4 (20 %) aus Racheninfektionen (Abb. 5). Dieses Ergebnis deutet auf eine bevorzugte Expression von GRAB während der Hautinfektion hin.



**Abb. 5: Übersicht der  $\alpha_2$ -M bindenden Isolate.** Die 20 positiv getesteten Stämme stammten zu 80 % aus Hautinfektionen, während 20 % klinischen Rachenisolaten zugeordnet wurden.

## 2. Nachweis von *grab* in klinischen Gruppe A Streptokokken

Ausgehend von den Ergebnissen der Bindungsstudien wurden die bakteriellen GAS Isolate auf das Vorhandensein von *grab* überprüft. Das bakterielle Oberflächenprotein GRAB ist neben einem 78 kDa großen, jedoch nicht näher identifizierten Protein (Chhatwal *et al.*, 1987), bislang das einzige bekannte  $\alpha_2$ -M Bindungsprotein von *S. pyogenes* (Rasmussen *et al.*, 1999).

Die Detektion des GRAB kodierenden Gens erfolgte durch PCR (V 7.4), unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *grab*-F und *grab*-R (siehe V 4.). GAS, bei denen *grab* nicht durch PCR nachgewiesen werden konnte (n = 12), wurden zusätzlich durch Southern Blot Analyse unter Verwendung einer DIG-markierten *grab* DNA-Sonde (Amplifikat aus GAS A82 mit den Primern *grab*-F/*grab*-R) untersucht (V 7.7).

Insgesamt wurden bei diesem Versuch 103 verschiedene klinische GAS Isolate aus Deutschland und 23 australische Isolate getestet (VII 1.). Das GRAB kodierende Gen konnte in allen Stämmen nachgewiesen werden. Sowohl die PCR als auch die Southern Blot Analyse zeigten, dass die GRAB kodierende Sequenz in ihrer Länge hoch variabel ist. Die Größe der detektierten Fragmente lag aufgrund einer wechselnden Anzahl von 84 bp langer Wiederholungssequenzen (Abb. 5, R<sub>1</sub>-R<sub>x</sub>) zwischen 500-1200 bp. Ein Zusammenhang zwischen Anzahl der Wiederholungssequenzen und der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität konnte nicht festgestellt werden.

## 3. Analyse der Interaktion von GRAB und $\alpha_2$ -M

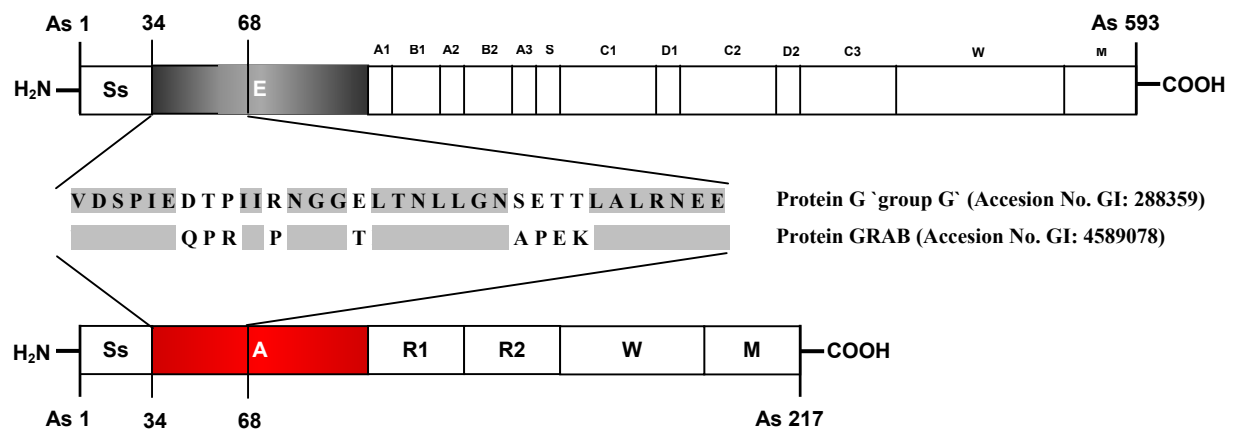
In bisherigen Studien (Rasmussen *et al.*, 1999) wurde gezeigt, dass die Fähigkeit von *S. pyogenes* mit  $\alpha_2$ -M zu interagieren durch das bakterielle Oberflächenprotein GRAB vermittelt wird. Das GRAB kodierende Gen konnte in unterschiedlichen Größen in allen getesteten GAS Stämmen nachgewiesen werden (III 2.) und ist in seiner Sequenz hoch konserviert (Rasmussen *et al.*, 1999). Die Analyse der  $\alpha_2$ -M-Bindung an verschiedene klinische Isolate nach Scatchard ergab zwei unterschiedliche Bindungsstellen, davon eine mit hoher und die Andere mit niedriger Affinität für  $\alpha_2$ -M (Rasmussen *et al.*, 1999; diese Arbeit). Versuche zur Isolierung eines zweiten putativen Bindungspartners mittels SDS-PAGE Analyse, Affinitätschromatographie und N-terminaler Sequenzierung verliefen negativ. Mit Ausnahme von Protein GRAB konnte kein weiteres  $\alpha_2$ -M bindendes Protein von *S. pyogenes* isoliert

und identifiziert werden. Protein GRAB ist das Einzige  $\alpha_2$ -M Bindungsprotein von *S. pyogenes*.

Da die Deletion des Membranankers von Protein GRAB in *S. pyogenes* KTL3 zu einem vollständigen Verlust der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität der aus KTL 3 generierten Mutante (MR4) führte (Rasmussen *et al.*, 1999), wurde ein zweites  $\alpha_2$ -M Bindungsmotiv in GRAB vermutet. Diese Annahme wurde durch die, in den folgenden Versuchen dargestellte, Analyse der  $\alpha_2$ -M Bindungsmotive von GRAB überprüft.

### 3.1 Lokalisation der $\alpha_2$ -M bindenden Domäne in GRAB

Die Identifizierung von Protein GRAB erfolgte aufgrund einer 71 %igen Homologie zur  $\alpha_2$ -M bindenden Domäne-E aus Protein G (Abb. 6) (Rasmussen *et al.*, 1999). Daher wurde das  $\alpha_2$ -M Bindungsmotiv von Protein GRAB im N-terminalen Bereich der A-Domäne vermutet. Der zu Protein G homologe Abschnitt (As 34-67) in GRAB wurde als  $\Delta A$  bezeichnet.

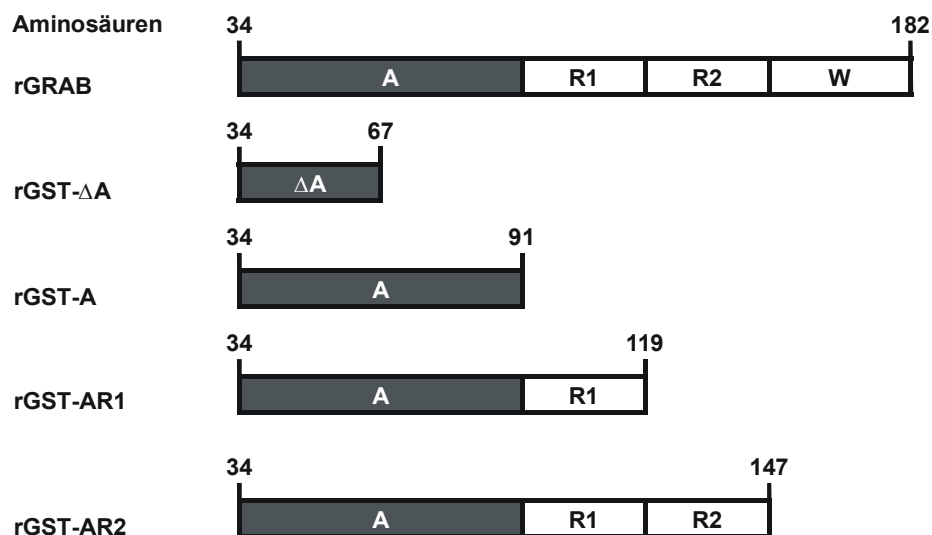


**Abb. 6: Modell des Protein G und GRAB mit homologen Regionen der Domänen E und A.** Vergleich von Protein G der Gruppe G Streptokokken mit dem aus Gruppe A Streptokokken stammendem Oberflächenprotein GRAB. Beide Proteine sind in der Lage natives „slow-form“  $\alpha_2$ -M über ein in der E- bzw. A-Domäne lokalisiertes Motiv zu binden, ohne es zu inaktivieren. Ein Vergleich beider Domänen ergab eine 71 %ige Homologie im N-terminalen Bereich (As 34-67). Die identischen Sequenzen sind grau unterlegt. Bei den als A und B bezeichneten Bereichen (in Protein G) handelt es sich um die Bindungsdomänen für humanes Serum Albumin. Die IgG bindenden Domänen wurden mit C bezeichnet.

### 3.2 Klonierung, Produktion und Reinigung rekombinanter GRAB Proteine

In der Absicht die  $\alpha_2$ -M bindende Domäne von Protein GRAB auf ein minimales Bindungsepitop einzugrenzen, wurden fünf rekombinante, im C-Terminus verkürzte His-Tag bzw. GST-Fusionsproteine rGRAB, rGST- $\Delta$ A, rGST-A, rGST-AR1 und rGST-AR2 (Abb. 7) hergestellt und gereinigt (V 8.3.1, 8.3.2).

Als Ausgangs-DNA für die PCR (V 7.4) wurde chromosomale DNA von GAS A82 verwendet. Die *grab*-Sequenz von A82 stimmt mit der des *S. pyogenes* Referenzstammes SF370 (Accession no. GI:4589078) überein. Nach Subklonierung in den Vektor pCR2.1 wurden die Fragmente in die Expressionsvektoren pQE-30 bzw. pGEX-6P-1 ligiert. Die verwendeten Oligonukleotide, Größe und Position der amplifizierten PCR-Fragmente sowie die resultierenden Plasmide sind in Tab. 12 und Tab. 13 zusammengefasst.



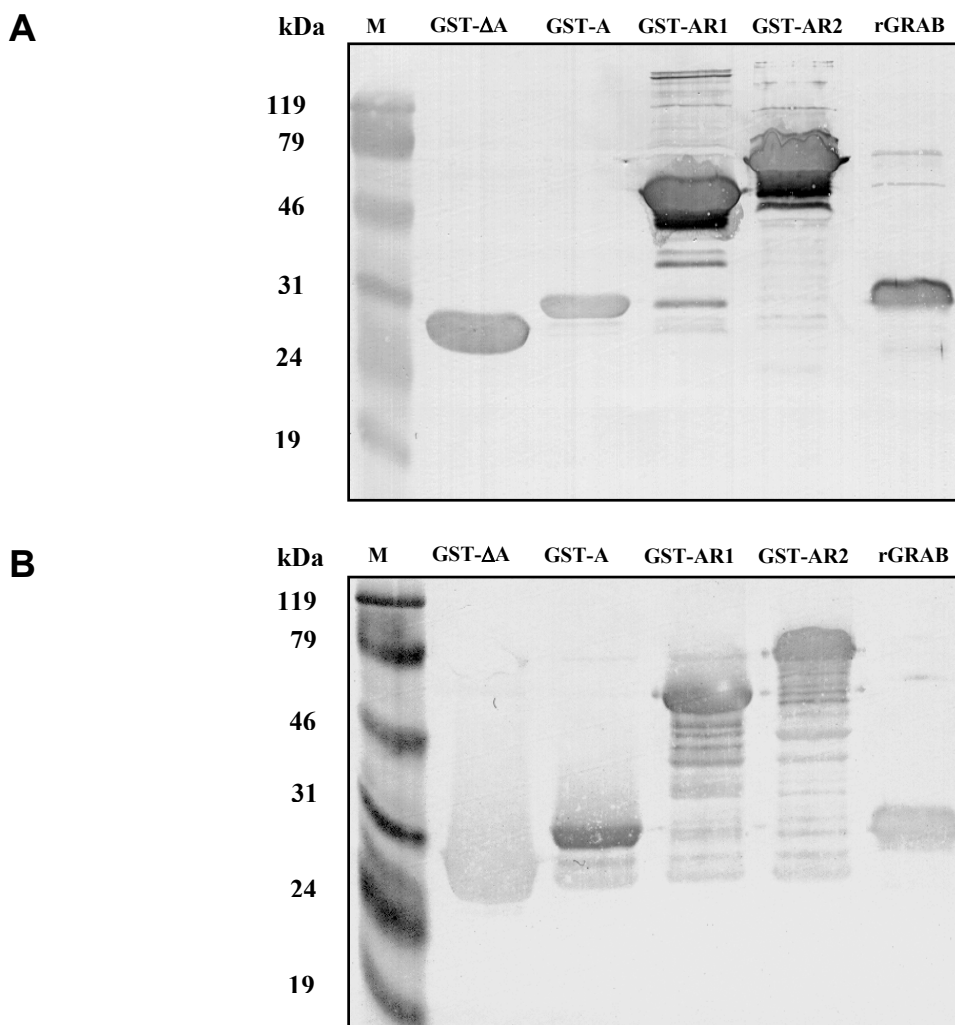
**Abb. 7: Modell der rekombinanten GRAB-Peptide.** Die funktionellen Domänen wurden wie folgt bezeichnet:  $\Delta$ A: N-terminaler Bereich von A mit Homologie zu Protein G; A: gesamte  $\alpha_2$ -M bindende Domäne; R1-R2: Repetitive Einheiten; W: Zellwand durchspannende Domäne.



### 3.3 Eingrenzung der $\alpha_2$ -M Bindungsdomäne auf $\Delta A$ in GRAB

Die rekombinanten GRAB-Peptide wurden in der SDS-PAGE (V 8.4) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Liganden Assay (V 8.4.2) auf ihre  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität untersucht (Abb. 8A). Zur Kontrolle wurde parallel ein Immunblot (V 8.4.1) mit anti-GRAB Antikörpern durchgeführt (Abb. 8B).

Es konnte gezeigt werden, dass jedes der hergestellten rGRAB Peptide in der Lage ist den menschlichen Protease Inhibitor  $\alpha_2$ -M zu binden. Die Ergebnisse zeigten auch eine Bindung von  $\alpha_2$ -M in der  $\Delta A$ -Region. Daher war anzunehmen, dass weder der C-terminale Bereich der A-Region noch die Wiederholungssequenzen eine Rolle für die Bindung spielen. Die als negativ Kontrolle eingesetzte rekombinante Glutathion S-Transferase regierte nicht mit  $\alpha_2$ -M und nicht mit den anti-GRAB Antikörpern.



**Abb. 8: Analyse der rekombinanten GRAB Fusionsproteine. A,**  $\alpha_2$ -M Liganden Assay; **B,** Immunblot Analyse mit polyklonalem anti-GRAB IgG. Alle überprüften GRAB-Peptide waren in der Lage  $\alpha_2$ -M als Liganden zu binden. Diese Ergebnisse bestätigten  $\Delta A$  als kleinste funktionelle Bindungsdomäne von Protein GRAB.

### 3.4 Kompetitive Inhibition der $\alpha_2$ -M Bindung an *S. pyogenes*

Die Funktion der  $\Delta A$ -Region als  $\alpha_2$ -M bindende Domäne wurde im Liganden-Assay gezeigt (Abb. 8A) und zur Bestätigung in kompetitiven Inhibitionsstudien überprüft (Abb. 9). Zu diesem Zweck wurde die Bindung von radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ - $\alpha_2$ -M an die Streptokokken Isolate KTL3, A6 und A158 unter Zugabe steigender Konzentrationen von rGST- $\Delta A$  und rGST-A bestimmt. Alle drei Stämme wurden bereits in vorhergehenden Versuchen als  $\alpha_2$ -M bindende Bakterien bestätigt (Tab. 17). Die Ergebnisse der kompetitiven Inhibition zeigten, dass sowohl rGST- $\Delta A$  als auch rGST-A die Bindung von  $\alpha_2$ -M an Gruppe A Streptokokken kompetitiv inhibierten. Die Ergebnisse bestätigten somit die Annahme von  $\Delta A$  als  $\alpha_2$ -M bindende Region.

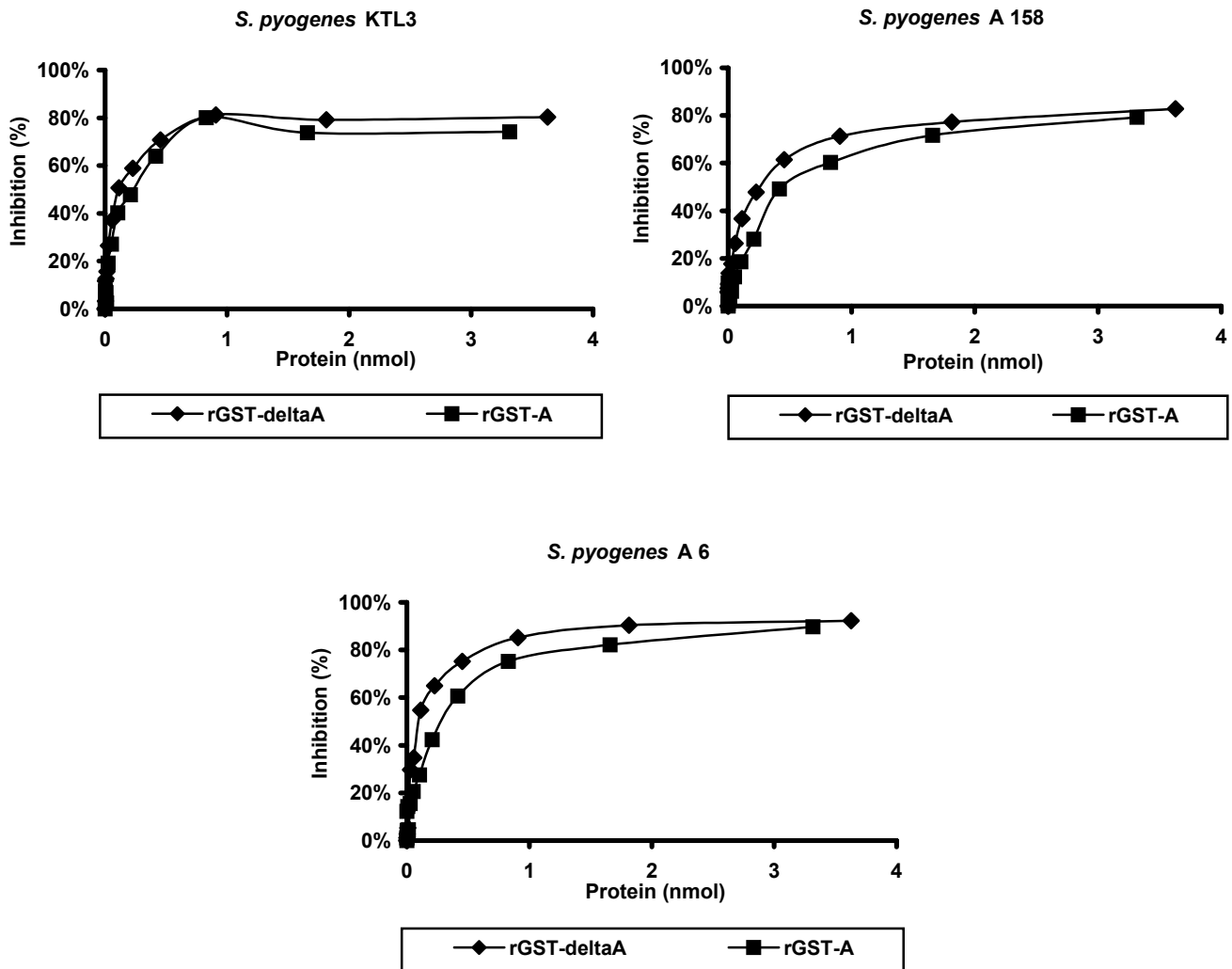


Abb. 9: Kompetitive Inhibition der  $^{125}\text{I}$ - $\alpha_2$ -M Bindung an die *S. pyogenes* Isolate A6, A158 und KTL3 unter Zugabe steigender Konzentrationen von aufgereinigtem GRAB-Peptid, rGST- $\Delta A$  und rGST-A.

### 3.5 Identifizierung der minimalen $\alpha_2$ -M bindenden Motive in GRAB

**3.5.1 Eingrenzung der  $\alpha_2$ -M Bindungsmotive durch synthetische, membrangekoppelte Peptide.** Zur Lokalisation der für die Bindung von  $\alpha_2$ -M erforderlichen Bindungsstelle in der A-Region von GRAB, wurde die A-Domäne (Abb. 10A) in 44 überlappende Peptide von je 15 Aminosäuren Länge aufgeteilt. Die Sequenz der membrangekoppelten immobilisierten Peptide wurde um jeweils eine Position verschoben. Aneinandergrenzende Peptide stimmten in jeweils 14 Aminosäuren überein. Die Fähigkeit der Peptide menschliches  $\alpha_2$ -M spezifisch zu binden wurde im Liganden Assay untersucht (V 8.4.3).

Anhand der  $\alpha_2$ -M-Bindungsanalyse (Abb. 10B) wurden zwei unterschiedliche Serien reaktiver Peptide identifiziert. Die positiven Peptide sind an Position 7 bis 10 und Position 17 bis 18 lokalisiert (Abb. 10C). Beide Peptidsequenzen, bestehend aus Aminosäuren 40 bis 57 bzw. 50 bis 65, repräsentierten Sequenzen der  $\Delta$ A-Domäne von Protein GRAB.



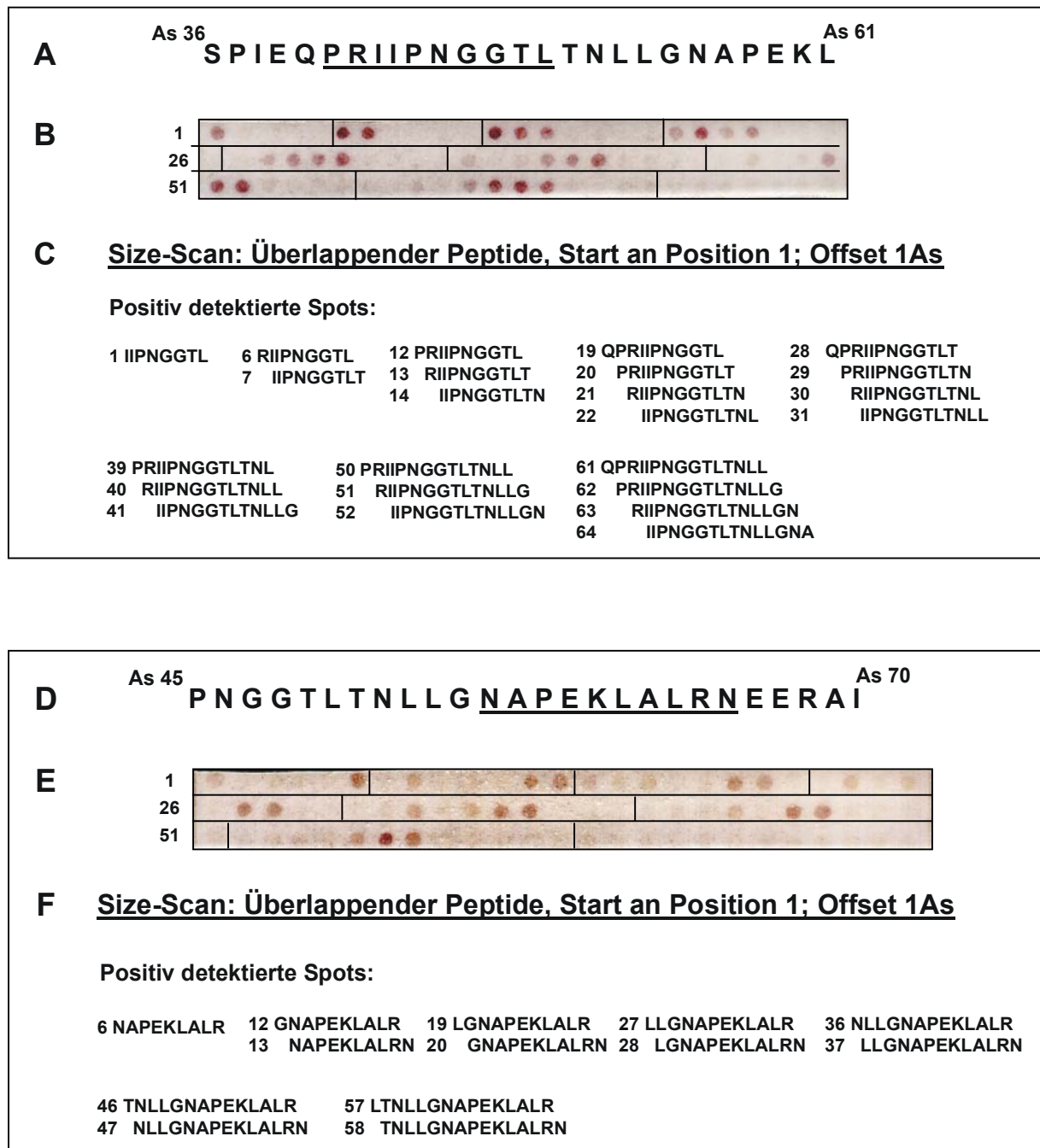
**Abb. 10: Identifikation möglicher  $\alpha_2$ -M Bindungsmotive der A-Domäne von GRAB.** **A**, Aminosäuresequenz von Domäne-A; **B**, Bindung von  $\alpha_2$ -M an Peptide der Spot-Membran. Die 58 Aminosäuren der Region A wurden in 44 Überlappende Peptide aufgeteilt. Die 15 Aminosäuren langen Peptide sind um jeweils eine Position verschoben und wurden unter Zugabe von  $\alpha_2$ -M untersucht. **C**, Position und Sequenz der positiven und mit  $\alpha_2$ -M reagierenden Peptidspots.

**3.5.2 Identifikation der minimalen Bindungsmotive in der  $\Delta A$ -Region.** Basierend auf den Ergebnissen der ersten Peptidanalyse (III 3.5.1) wurden zwei weitere Serien von Peptidspotmembranen hergestellt. Die bereits identifizierten, an der Bindung beteiligten Sequenzen sollten mittels der Peptidarray Technologie weiter eingegrenzt werden.

Es wurden zwei überlappende Regionen bestehend aus Aminosäuren 36 bis 61 (Abb. 11A) und Aminosäuren 45 bis 70 (Abb. 11D) in jeweils kurze sich ebenfalls überlappende Peptide unterteilt, und hinsichtlich ihrer  $\alpha_2$ -M Bindungskapazität untersucht. Die Region 36 bis 61 wurde dabei in 68 verschiedene sich überlappende Peptide unterteilt deren Sequenz um je eine Aminosäurenposition verschoben war. Die Peptide wurden in 8 Serien unterschiedlicher Größe, von 8 bis 15 Aminosäuren pro Spot, auf der Membran angeordnet. Die zweite Region, bestehend aus Aminosäuren 45 bis 70, wurde entsprechend in 63 überlappende Peptide unterteilt und in 7 Serien von 9 bis 15 Aminosäuren pro Spot auf der Membran immobilisiert. Die Sequenzen und ihre Positionen sind im Anhang (VII 2.) dargestellt.

Die Analyse der  $\alpha_2$ -M-Bindungsaktivität der synthetischen Peptide im Liganden Assay (V 8.4.3) ergab 24 reaktive Peptidspots auf der ersten (Abb. 11B) und 13 auf der zweiten Membran (Abb. 11E). Als minimales Bindungsmotiv der ersten Sequenz (As 36-61) wurde das acht Aminosäuren lange Peptid **IIPNGGTL** identifiziert. Die Bindungsaktivität des Peptids wurde durch die N-terminale Verlängerung um Prolin und Arginin deutlich verstärkt (Abb. 11C). An der Bindung von  $\alpha_2$ -M an GRAB ist demnach das zehn Aminosäuren lange Peptid **PRIIPNGGTL** (As 41-50) in der ersten Region beteiligt.

Durch die Analyse der zweiten Membran wurden ein neun Aminosäuren langes Peptid **NAPEKLALR** bzw. das Zehnerpeptid **NAPEKLALRN** als minimale Bindungsmotive für  $\alpha_2$ -M identifiziert. Eine C-terminale Verlängerung des Zehnerpeptids um Glutaminsäure resultierte in einem vollständigen Verlust der Bindungsaktivität (Abb. 11F). Die Ergebnisse dieser Peptidanalysen zeigten, dass die Interaktion von GRAB und  $\alpha_2$ -M vermutlich über zwei verschiedene in  $\Delta A$  lokalisierte Motive vermittelt wird.



**Abb. 11: Analyse der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von GRAB durch synthetische Peptide.** *A* und *D*, Aminosäuresequenzen, die für die Entwicklung der synthetischen Peptide verwendet wurden. *B*, Spot Membran bestehend aus 8 Serien überlappender Peptide von 8 bis 15 Aminosäuren Länge, beginnend mit IIPNGGTL an Position 1 als Initialsequenz. *E*, Darstellung der zweiten Spot Membran, bestehend aus 7 Serien überlappender Peptide von 9 bis 15 Aminosäuren Länge. Als Anfangssequenz an Position 1 wurde NLLGNAPE verwendet. *C* und *F*, Positionen und Aminosäuresequenzen der positiven,  $\alpha_2$ -M bindenden Spots. Die minimalen Bindungsmotive sind PRIIPNGGTL in der Ersten und NAPEKLALRN in der zweiten Region. Sequenzen, Positionen und vergleichende densitometrische Analyse aller Peptide sind im Anhang (VII 2.) dargestellt.

**3.5.3 Analyse der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität systematisch substituierter Peptide von GRAB.** In der vorhergehenden Spot-Membran Analyse (III 3.5.2) wurden zwei  $\alpha_2$ -M bindende Motive (PRIIPNGGTL und NAPEKLALRN) in der  $\Delta$ A-Domäne von Protein GRAB identifiziert. Für die Ermittlung der für die Bindung kritischen Aminosäuren wurde jede einzelne Position in den Motiven systematisch gegen jede der zwanzig Aminosäuren ausgetauscht (VII 2.). Die modifizierten, membrangekoppelten Peptide wurden daraufhin auf ihre  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität hin überprüft (Abb. 12A; Abb. 13A). Die Ergebnisse zeigten, dass Substitutionen gegen saure Aminosäuren wie Asparagin- oder Glutaminsäure, unabhängig von der Position, zu einem vollständigen Bindungsverlust in beiden Motiven führten. Ein Austausch gegen basisches Lysin verstärkte die Bindungsaktivität im zweiten Motiv. Es wurde deutlich, dass insbesondere Arginin an Position 42 im ersten sowie Arginin an Position 64 im zweiten Motiv die  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von Protein GRAB stark beeinflussen. Der Austausch dieser Aminosäuren führte, ebenso wie der von Lysin an Position 60, zu einem Verlust der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität (Abb. 12B; 13B). Aufgrund der vorhergehenden Versuche (Abb. 10; Abb. 11F) wurde diese Aminosäure jedoch als nicht essentiell eingestuft. Das Peptid TLTNLLGNAPEK<sup>60</sup>LAL mit Lysin an Position 60 war im Gegensatz zu dem Peptid LTNLLGNAPEK<sup>60</sup>LALR<sup>64</sup> mit Arginin an Position 64 nicht in der Lage  $\alpha_2$ -M zu binden (Abb. 10, Spot Nr. 16-17).

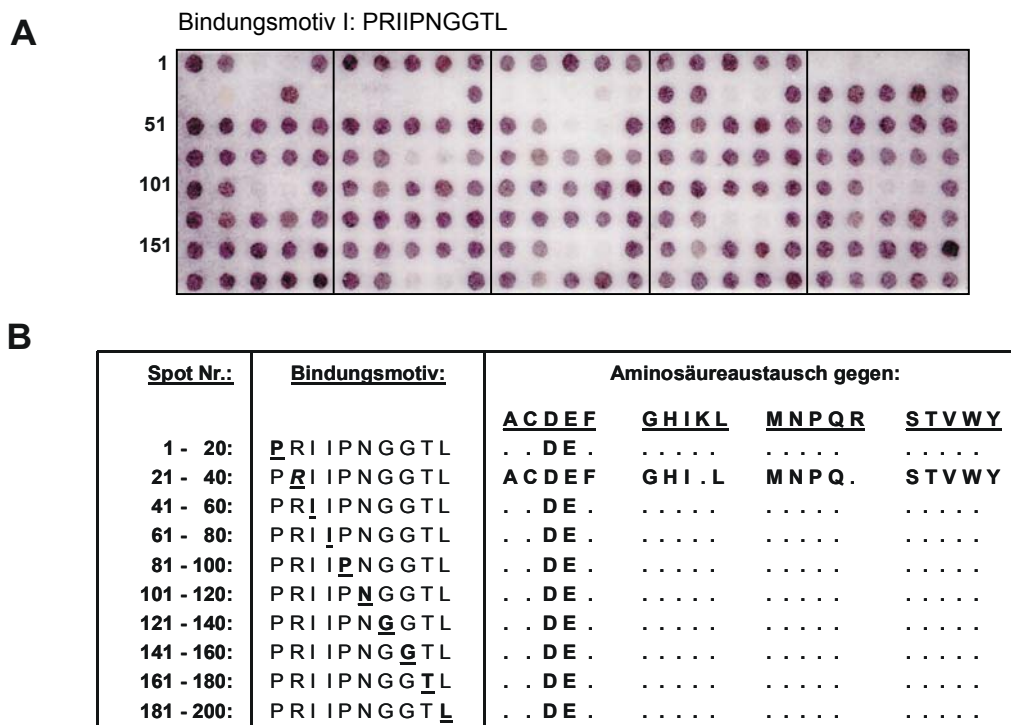
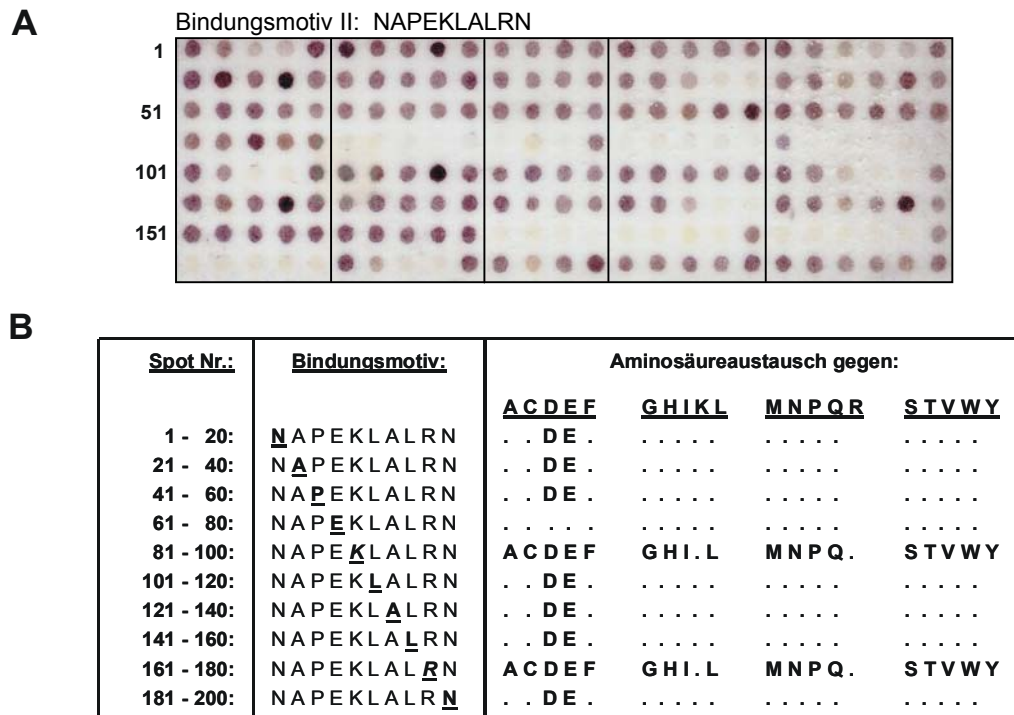


Abb. 12: Identifizierung der für die  $\alpha_2$ -M Bindung essentiellen Aminosäuren in Motiv I (PRIIPNGGTL)

durch die Analyse der Bindungsaktivität systematisch substituierter GRAB Peptide. **A**, Spot-Membran Analyse der synthetischen modifizierten Peptide. Jede Aminosäure in Motiv I wurde systematisch durch jede der 20 Aminosäuren substituiert. Die relative  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität der 200 Peptide wurde densitometrisch bestimmt. **B**, Übersicht von Spot-Nummer und Position der ausgetauschten Aminosäureposition im Bindungsmotiv (hervorgehoben, unterstrichen). Die Reihenfolge der ausgetauschten Aminosäuren ist unterstrichen dargestellt (A  $\rightarrow$  Y). Substitutionen, die zu einem Bindungsverlust führten, wurden ausgeschrieben.



**Abb. 13: Identifizierung der für die  $\alpha_2$ -M Bindung essentiellen Aminosäuren in Motiv II (NAPEKLALRN) durch die Analyse der Bindungsaktivität systematisch substituierter GRAB Peptide. **A**, Spot-Membran Analyse der synthetischen modifizierten Peptide. Jede Aminosäure in Motiv II wurde systematisch durch jede der 20 Aminosäuren substituiert. Die relative  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität der 200 Peptide wurde densitometrisch bestimmt. **B**, Übersicht von Spot-Nummer und Position der ausgetauschten Aminosäureposition im Bindungsmotiv (hervorgehoben, unterstrichen). Die Reihenfolge der ausgetauschten Aminosäuren ist unterstrichen dargestellt (A  $\rightarrow$  Y). Substitutionen, die zu einem Bindungsverlust führten wurden ausgeschrieben.**

### 3.6 Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen von R42 und R64 in rGRAB auf die Bindung von $\alpha_2$ -M

**3.6.1 Mutagenese von *grab*.** Für die Mutagenese von *grab* (V 7.6) wurden zunächst zwei überlappende DNA Fragmente mit Einzelbasenpaaraustauschen mittels PCR amplifiziert, fusioniert (V 7.4) und das so generierte PCR-Produkt in den Vektor pGEM-T Easy kloniert

(V 7.8). Die Fragmente wurden anschließend ausgeschnitten und über *Bam*HI/ *Kpn*I in den Expressionsvektor pQE30 subkloniert. Als Ausgangs DNA wurde chromosomale DNA von GAS A82 verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide, eingeführte Punktmutationen sowie die daraus resultierenden DNA Fragmente sind in Tab. 1 aufgeführt. Für die Generierung der DNA-Inserts von pQGR42/64 mit Einzelbasenpaarsubstitutionen an Nukleotidpositionen 124 und 190 wurde die Plasmid DNA von pQGR42 als Ausgangs DNA verwendet. Insgesamt wurden drei verschiedene Konstrukte (pQGR42, pQGR64 und pQGR42/64) generiert. Die gezielten Punktmutationen von *grab* führten zu Glycin-Substitutionen an Position Arginin<sup>42</sup>, Arginin<sup>64</sup> und Arginin<sup>42/64</sup> in den rekombinanten Proteinen rGRAB<sup>42</sup>, rGRAB<sup>64</sup> und rGRAB<sup>42/64</sup>.

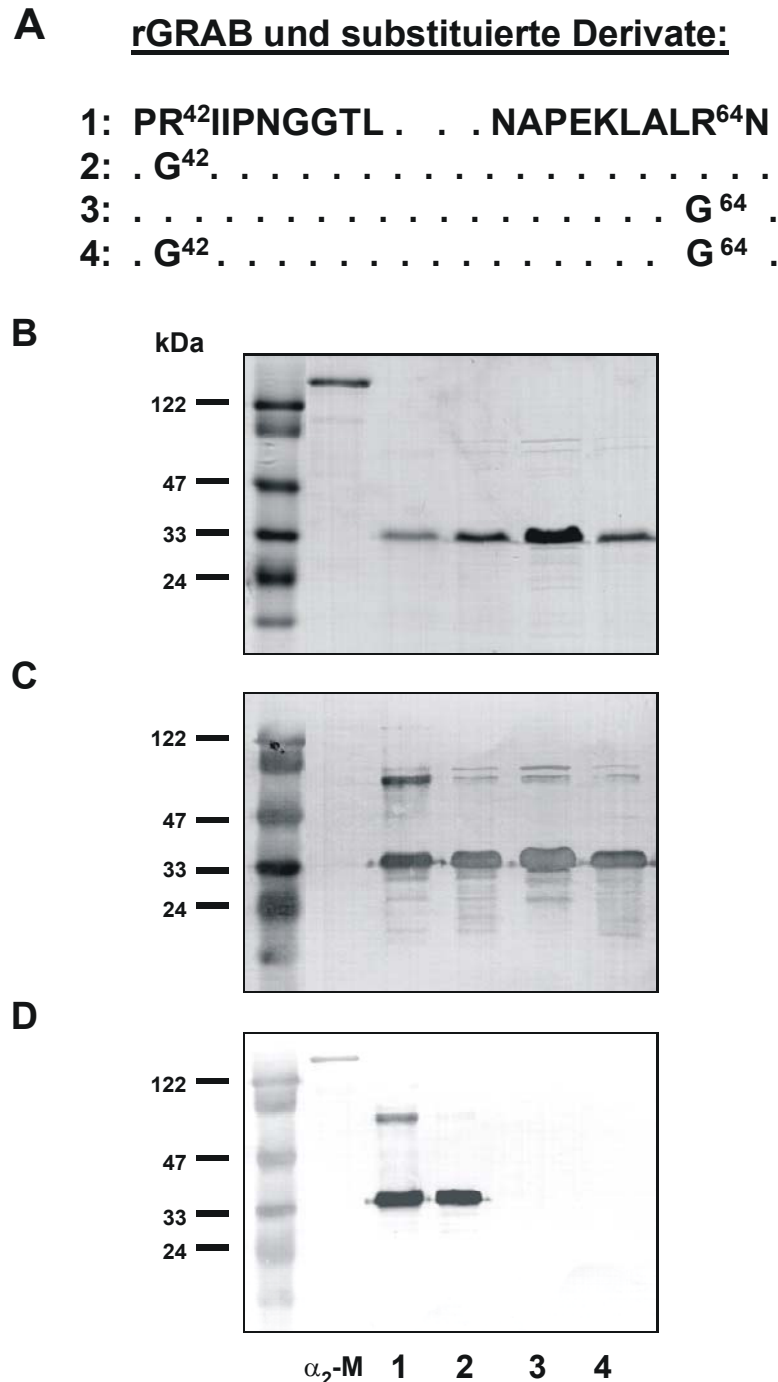
Nr.:	Name:	Oligonukleotidsequenz:	Nukleotid	Primer –PCR	
			Pos. in <i>grab</i>	-Produkt	
1	grab-F	5'-ATGGGAAAAGAAATAAAAGTGAAATGC-3'	1-27		
3	grab- <i>Bam</i> HI	5'-CGC <u>GGATCC</u> GTTGACTCACCTATCGAACAGCC-3'	100-122		
4	grab- <i>Kpn</i> I	5'-CGG <u>GGTACC</u> CTAGGTATTAACGTTTTGTCTTCTCTTT-3'	546-520		
9	MI-F	5'-CCTATCGAACAGCCT( <sup>E/C</sup> )GAATTATTCCAAATGGCGGAAC-3'	109-146	1 / 10	PCR 1
10	MI-R	5'-CCATTGGAATAATTC( <sup>E/C</sup> )AGGCTGTTCGATAGGTGAG-3'	140-105	9 / 4	PCR 2
11	MII-F	5'-CAGAAAACTGGCATT( <sup>E/C</sup> )GTAATGAAGAAAGAGCCATTGATG-3'	173-214	3 / 12	PCR 3
12	MII-R	5'-GCTCTTCTTCATTAC( <sup>E/C</sup> )TAATGCCAGTTTTCTGGAG-3'	206-170	11 / 4	PCR 4

**Tab. 1: Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese von Arg<sup>42</sup> und Arg<sup>64</sup>.** Synthetische Oligonukleotide zur Herstellung der mutierten *grab* DNA-Fragmente, für die rGRAB-Proteine mit Aminosäure Substitutionen. Der Austausch von Arg<sup>42</sup> und Arg<sup>64</sup> erfolgte unter Verwendung punktmutierter synthetischer Oligonukleotide (Primer Nr. 9, 10, 11 und 12). Dazu wurde in beiden Fällen das Arginin kodierende Triplet CGA gegen das Codon GGA für Glycin ausgetauscht. Die Insert-DNA für pQGR-42 (rGRAB42) wurde mittels Fusions-PCR der Produkte 1 und 2 sowie den externen Primern 3 und 4 erstellt. pQGR-64 (rGRAB<sup>64</sup>) wurde aus den PCR Produkten 3 und 4 unter Verwendung der externen Primer 3 und 4 generiert. Für die Herstellung der Doppelmutante pQGR-42/64 (rGRAB<sup>42/64</sup>) wurde das Protokoll von pQGR-64 verwendet, mit pQGR-42 als Template DNA.

**3.6.2  $\alpha_2$ -M-Liganden Bindungstest an substituierten rGRAB Peptiden.** Um die Auswirkung der Mutagenese (Abb. 14A) auf die Interaktion mit  $\alpha_2$ -M zu testen wurden die hergestellten Proteine rGRAB, rGRAB42, rGRAB64 und rGRAB42/64 mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 14B) und im Western Blot untersucht. Die Analyse ergab, dass eine



Substitution von Arginin an Position 42 gegen Glycin keinen Einfluss auf die  $\alpha_2$ -M Bindung hatte, während eine Substitution von Arginin an Position 64 durch Glycin zu einem vollständigem Verlust der Bindungsaktivität führte (Abb. 14D). Als Kontrolle wurde ein Immunblot mit anti-GRAB IgG durchgeführt (Abb. 14C).



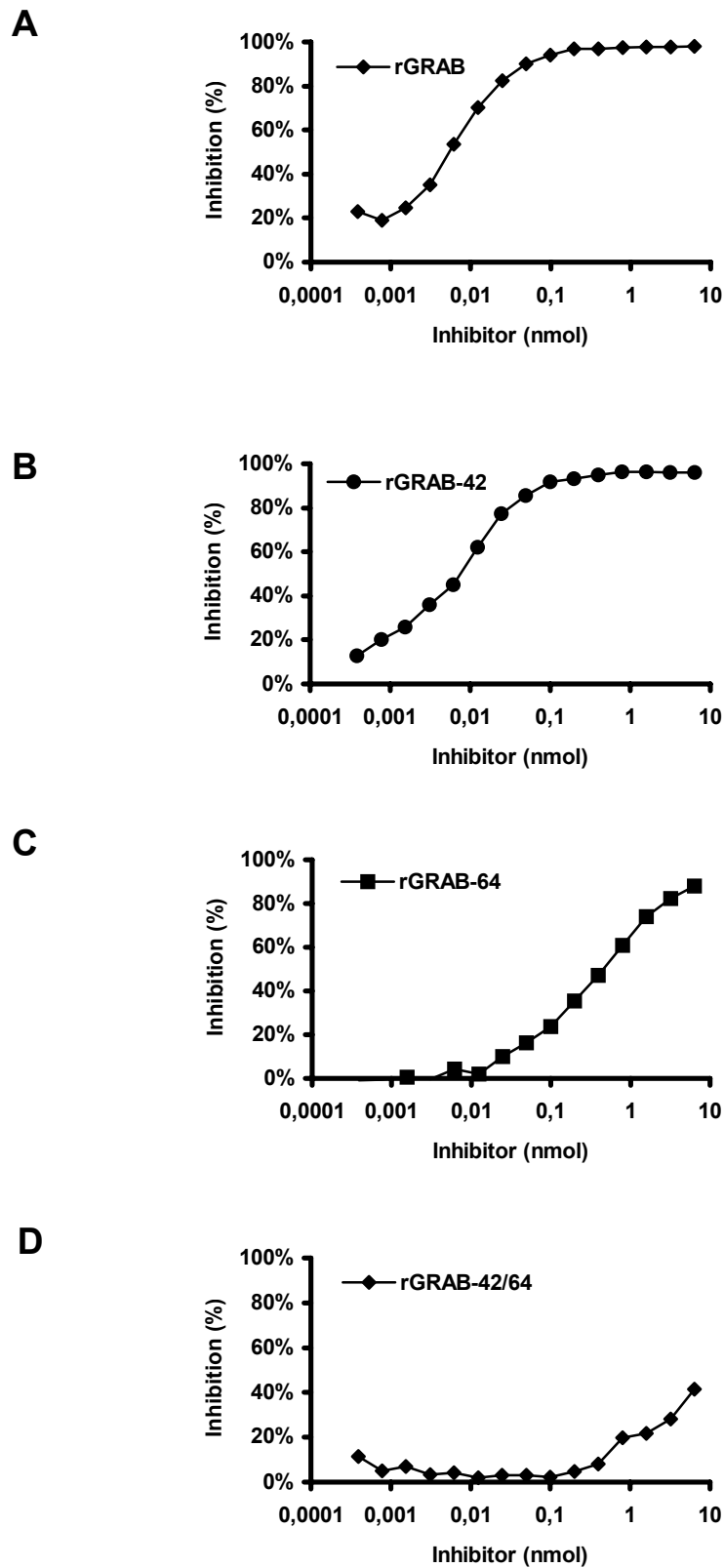
**Abb. 14:  $\alpha_2$ -M-Liganden Bindungsversuch mit aminosäuresubstituierten rGRAB Proteinen.** Die Auswirkung der Substitutionen von Arg<sup>42</sup>, Arg<sup>64</sup> und Arg<sup>42/64</sup> in den ermittelten  $\alpha_2$ -M Bindungsmotiven PRIIPNGGTL und NAPEKLALRN auf die  $\alpha_2$ -M Bindung der rekombinanten GRAB Proteine wurde im

Liganden Assay untersucht. **A**, Sequenzen der rekombinanten GRAB Proteine und Position des jeweiligen Aminosäureaustausches: rGRAB (1), rGRAB<sup>42</sup> (2), rGRAB<sup>64</sup> (3) und rGRAB<sup>42/64</sup> (4). **B**, Coomassie-Färbung der rekombinanten Proteine. **C**, Immunblot mit Kaninchen anti-rGRAB IgG. **D**, Blot-Overlay-Assay mit humanem  $\alpha_2$ -M. Die Ergebnisse zeigten einen Verlust der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von rGRAB<sup>64</sup> und rGRAB<sup>42/64</sup>. Die Bindungsaktivität von rGRAB<sup>42</sup> blieb erhalten.

**3.6.3 Kompetitive Inhibition der <sup>125</sup>I- $\alpha_2$ -M Bindung von *S. pyogenes* mit rekombinanten GRAB Proteinen.** Der Effekt der Gly-Substitution von Arg<sup>42</sup>, Arg<sup>64</sup> und Arg<sup>42/64</sup> auf die Bindungsaktivität der rekombinanten GRAB Proteine wurde in kompetitiven Inhibitionsstudien untersucht (Abb. 15). Die aufgereinigten Proteine rGRAB, rGRAB<sup>42</sup>, rGRAB<sup>64</sup> und rGRAB<sup>42/64</sup> wurden in Konkurrenz zu *S. pyogenes* KTL3 um <sup>125</sup>I-markiertes  $\alpha_2$ -M verwendet und in steigenden Konzentrationen von 6,6 ng bis 100  $\mu$ g pro Reaktion zugegeben. Die Bindung von <sup>125</sup>I- $\alpha_2$ -M an *S. pyogenes* KTL3 wurde als prozentualer Anteil der eingesetzten Aktivität dargestellt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die R42G Substitution keinen messbaren Einfluss auf die Interaktion mit  $\alpha_2$ -M hat. Die Bindung von <sup>125</sup>I- $\alpha_2$ -M an KTL3 konnte unter Zugabe steigender Mengen von GRAB<sup>42</sup> vollständig inhibiert werden (Abb. 15B) und verhält sich somit nahezu identisch zu rGRAB (Abb. 15A). Überraschenderweise war es ebenfalls möglich die Interaktion durch rGRAB<sup>64</sup> zu inhibieren (Abb. 15C), obwohl unter reduzierenden Bedingungen keinerlei Bindungsaktivität festgestellt werden konnte (Abb. 14D). Die Substitution beider Argininreste an Position 42 und 64 führte schließlich zu einem vollständigen Verlust der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität. Eine Inhibition von KTL3 mit rGRAB<sup>42/64</sup> war nicht möglich (Abb. 15D).

Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass insbesondere das Arginin an Position 64, gefolgt vom Arginin an Position 42 maßgeblich an der Bindung von  $\alpha_2$ -M beteiligt sind. Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von rGRAB<sup>64</sup> unter reduzierenden und physiologischen Bedingungen zeigten weiterhin, dass die Konformation von GRAB die Bindung von  $\alpha_2$ -M beeinflusst.

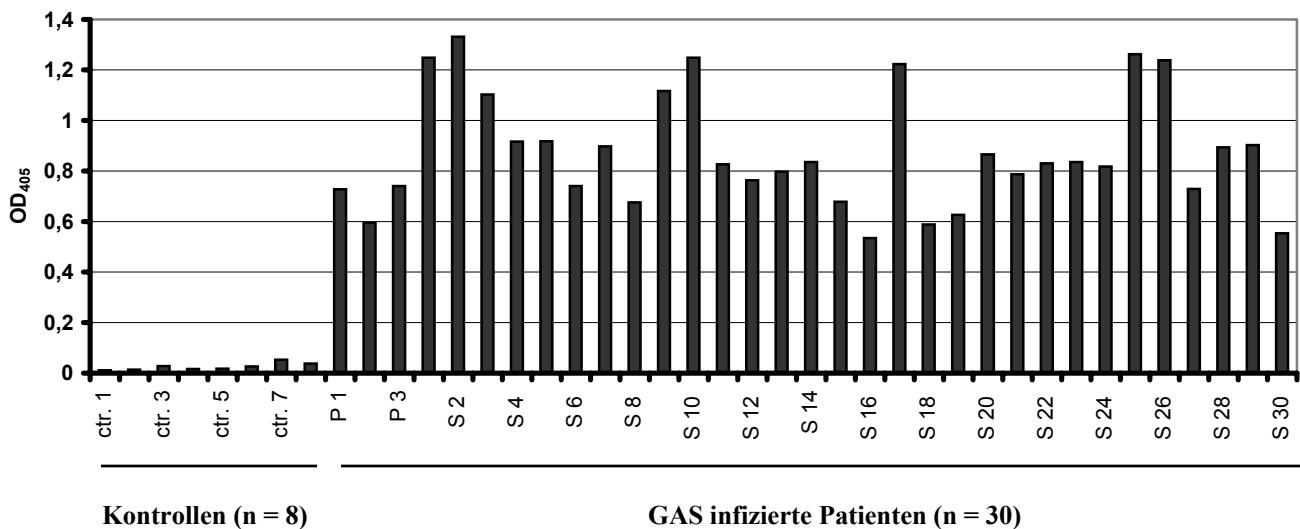


**Abb. 15:** Analyse der  $\alpha_2\text{-M}$  Bindungsaktivität von rGRAB<sup>42</sup>, rGRAB<sup>64</sup> und rGRAB<sup>42/64</sup> Protein durch kompetitive Inhibition der  $^{125}\text{I}$ - $\alpha_2\text{-M}$  Bindung an *S. pyogenes* KTL3. Die rekombinanten GRAB Proteine wurden in steigenden Konzentrationen von 6,6 ng bis 100  $\mu\text{g}$  pro Reaktion zugegeben: **A**, wildtyp rGRAB; **B**, rGRAB<sup>42</sup> (Substitution von Arg<sup>42</sup> durch Gly); **C**, rGRAB<sup>64</sup> (Substitution von Arg<sup>64</sup> durch Gly) und **D**, rGRAB<sup>42/64</sup> (Substitution von Arg<sup>42</sup> und Arg<sup>64</sup> durch Gly).

#### 4. Nachweis von Anti-GRAB IgG in Seren GAS infizierter Patienten

Die Präsenz von Protein GRAB auf der bakteriellen Oberfläche zum Zeitpunkt der Infektion wurde durch den Nachweis von anti-rGRAB Antikörpern in Seren rekonvaleszenter Patienten bestätigt (V 10.2). Die Seren stammten von an *S. pyogenes* erkrankten Pharyngitis- oder Pyodermiepatienten und wurden wenige Wochen nach Diagnose entnommen. Als Vergleich dienten die Seren gesunder, GAS seronegativer Personen aus dem gleichen geographischen Gebiet.

Die Ergebnisse zeigten, dass Seren rekonvaleszenter Patienten einen signifikant höheren Anteil an anti-rGRAB IgG Antikörper aufweisen als die Seren gesunder Probanden (Abb. 16). Protein GRAB ist prävalent und wird im Verlauf der Infektion durch das Immunsystem erkannt.



**Abb. 16: Nachweis von Anti-GRAB IgG in Seren GAS infizierter Patienten.** Für den Nachweis von Anti-rGRAB IgG wurden Seren von rekonvaleszenten zuvor an *S. pyogenes* erkrankten Patienten (n = 33) mit denen gesunder, GAS seronegativer Personen (n = 8) verglichen (CTR<sub>1</sub>-CTR<sub>8</sub>). Die untersuchten Seren stammten von Pharyngitis (P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub>) oder Pyodermie (S<sub>1</sub>-S<sub>30</sub>) Patienten und wurden wenige Wochen nach Diagnose entnommen. Die Präsenz von anti-rGRAB IgG wurde mittels konventionellem ELISA ermittelt.

## 5. Einfluss von Protein GRAB auf die bakterielle Virulenz

In den folgenden Versuchen wurde die Bedeutung von GRAB für den Infektionsprozess untersucht. Dazu wurde das  $\alpha_2$ -M bindende klinische *S. pyogenes* Isolat KTL3 mit einer aus KTL3 generierten *grab* Mutante MR4 (Tab. 15) in einem Maus Hautinfektionsmodell verglichen. Die Untersuchung von *S. pyogenes* KTL3 und MR4 sollte die biologische Funktion von Protein GRAB in der Pathogenese von *S. pyogenes* bzw. dessen Bedeutung für die bakterielle Virulenz aufzeigen.

Die Mutation von MR4 bestand in einer Deletion des Membranankers von *grab* (Rasmussen *et al.*, 1999). Aufgrund des fehlenden Membranankers kann das verkürzte GRAB-Peptid nicht in der Zellwand verankert werden und wird an das umgebende Medium sekretiert. Die Mutante ist frei von Oberflächen gebundenem Protein GRAB und nicht mehr in der Lage  $\alpha_2$ -M zu binden (III. 5.2.3).

### 5.1 Entwicklung eines Infektionsmodells in der Maus

**5.1.1 Einfluss der Mutation von *grab* auf das Wachstumsverhalten der *S. pyogenes* Mutante MR4.** In zwei unabhängigen Versuchen wurde das Wachstum von *S. pyogenes* KTL3 und MR4 untersucht. Die Ergebnisse zeigen ein identisches Wachstumsverhalten beider Stämme in THY Medium. Das Wachstum von KTL3 konnte durch die Zugabe von Kanamycin fast vollständig gehemmt werden, während das der Mutante nicht beeinflusst wurde (Abb. 17).

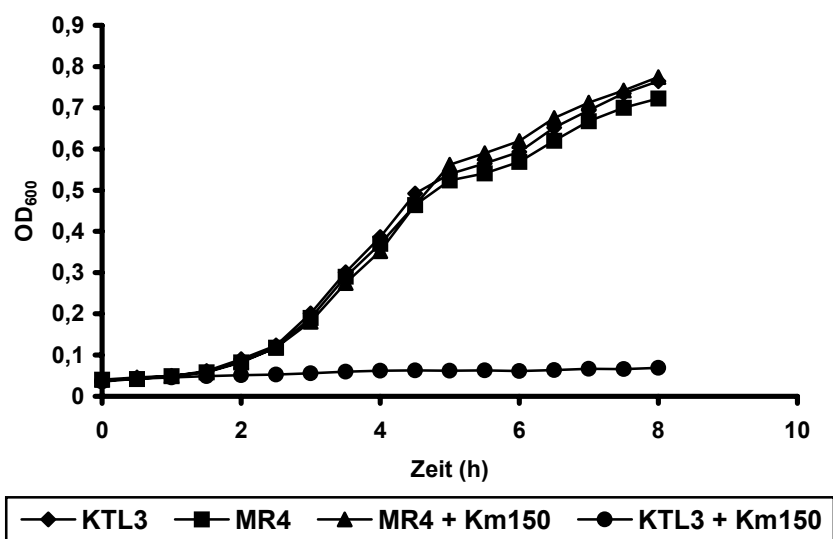
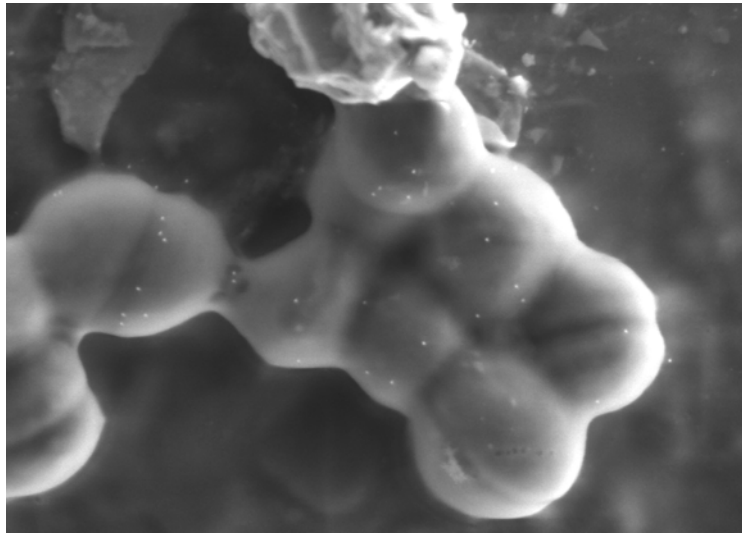


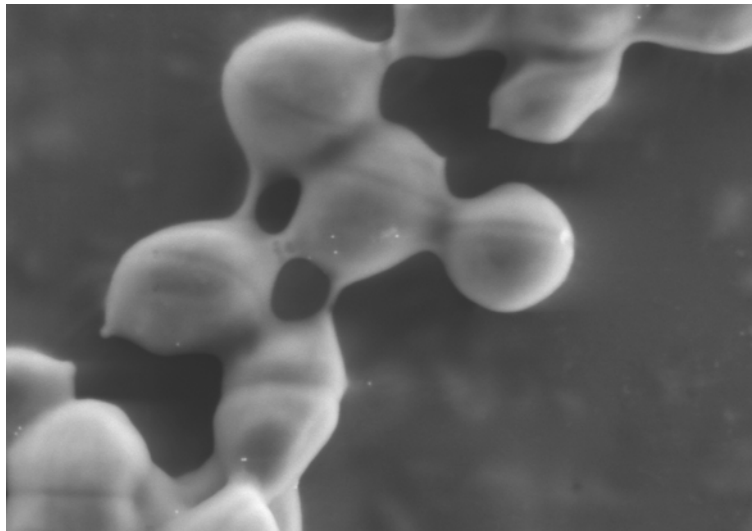
Abb. 17: Wachstumskurve von KTL3 und MR4 in THY-Medium

**5.1.2 Nachweis von Protein GRAB auf der bakteriellen Oberfläche von *S. pyogenes* KTL3.** Das bakterielle Oberflächenprotein GRAB wurde neben Bindungsstudien mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem  $\alpha_2\text{-M}$  zusätzlich in der Elektronenmikroskopie (V 12.2.1) durch Verwendung polyklonaler anti-GRAB IgG Antikörper (V 10.1.1) auf der Zellwand von *S. pyogenes* KTL3 nachgewiesen (Abb. 18A). Die Mutante MR4 diente als Negativkontrolle und war frei von oberflächengebundenem GRAB (Abb.18B).

**A**

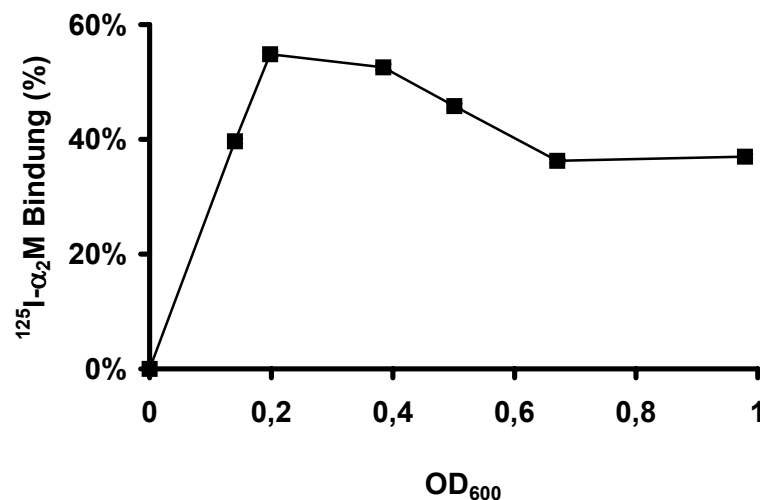


**B**



**Abb. 18: Oberflächenlokalisierung von Protein GRAB mittels Gold markierter Antikörper.** *A*, *S. pyogenes* KTL3; *B*, *S. pyogenes* Mutante MR4. MR4 ist aufgrund einer Deletion des Membranankers in *grab* frei von oberflächengebundenem GRAB. Die Detektion des Proteins erfolgte durch Immungold-Markierung im FESEM (Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop).

**5.1.3 Untersuchung der  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität in den Wachstumsphasen.** Die Bindungskapazität von *S. pyogenes* KLT3 im Verlauf des Wachstums wurde in  $\alpha_2$ -M Bindungsstudien unter Verwendung von  $^{125}$ I-markiertem  $\alpha_2$ -M untersucht (V 9.2). Unspezifische Wechselwirkungen mit anderen bakteriellen Faktoren wurden durch den Einsatz der *grab* Mutante MR4 als Kontrollstamm ausgeschlossen. Die maximale  $\alpha_2$ -M Bindungskapazität von KLT3 konnte während der frühen exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden. Bei Erreichen der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Phase fiel die Bindung auf ein Plateau von ca. 40 % ab (Abb. 19). Für die folgenden Infektionsversuche wurden Bakterien der frühen exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von 0,3 – 0,4) verwendet, in der *grab* maximal exprimiert wird.



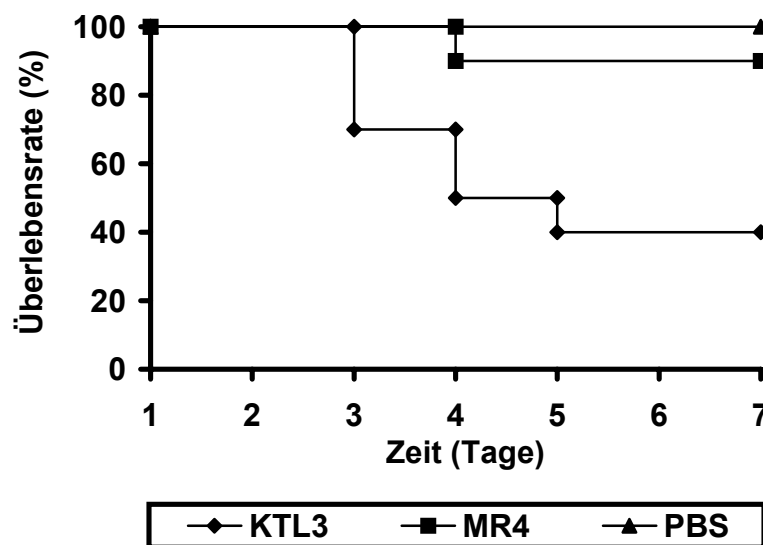
**Abb. 19:**  $^{125}$ I- $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von *S. pyogenes* KTL3 im Verlauf des Wachstums. Die Bakterien wurden während der frühen, mittleren und späten logarithmischen Wachstumsphase sowie aus der frühen und späten stationären Phase entnommen und hinsichtlich ihrer  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität getestet.

## 5.2 *In vivo* Virulenzstudien, Vergleich von KTL3 und MR4

Der Einfluss von Protein GRAB auf die bakterielle Virulenz wurde in *in vivo* Versuchen an BALB/c und C3H/HeN Mäusen untersucht. In einem hierfür entwickelten Hautinfektionsmodell wurde die Virulenz des GRAB exprimierenden *S. pyogenes* Stammes KTL3 mit der *grab* Mutante MR4 verglichen.

### 5.2.1 Überlebensrate der subkutan mit *S. pyogenes* KTL3 und MR4 infizierten Mäuse.

Bei diesem Versuch wurden Gruppen von jeweils zehn C3H/HeN Mäusen mit  $2,5 \times 10^8$  KBE pro Maus mit den *S. pyogenes* Stämmen KTL3 oder der *grab* Mutante MR4 infiziert (V 11.1). Die Bakterien wurden subkutan unter die Rückenhaut appliziert und die Überlebensrate täglich, über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Die Infektionsversuche zeigten eine Überlebensrate von 90 % der mit MR4 infizierten Mäusen. Von den mit dem Wildtyp KTL3 infizierten Tieren überlebten 40 % (Abb.20).



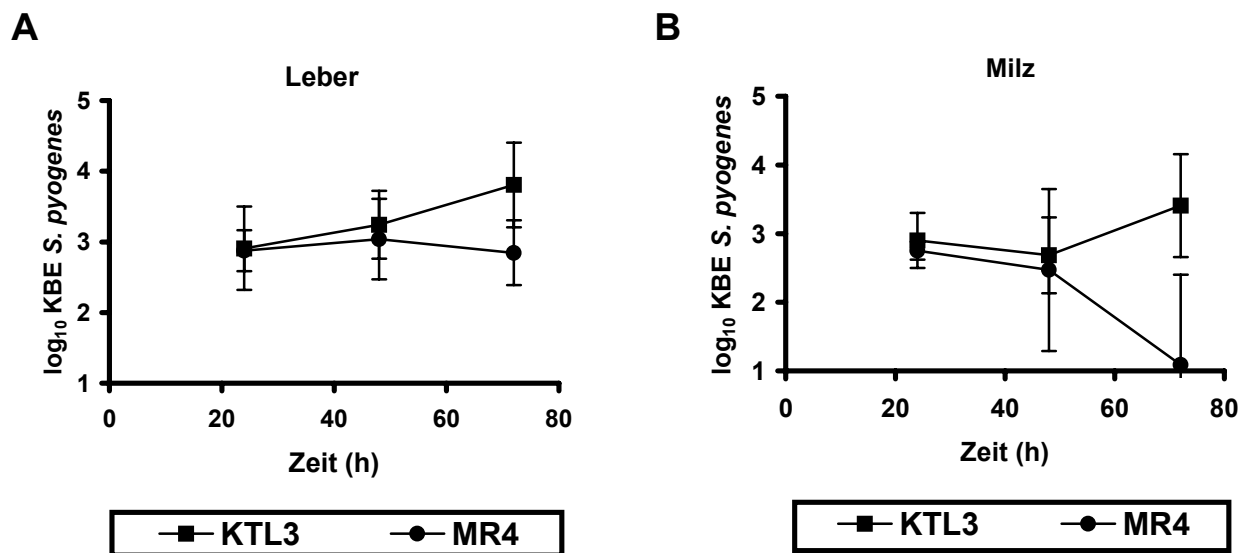
**Abb. 20: Überlebensrate subkutan infizierter C3H/HeN Mäuse nach Kaplan-Meier.** Pro Maus wurden jeweils  $2,5 \times 10^8$  KBE von *S. pyogenes* Stamm KTL3 (◆), der *grab* Mutante MR4 (■), oder PBS als Kontrolle (▲) in einem Volumen von jeweils 200 µl subkutan unter die Rückenhaut appliziert. Alle Tiere wurden täglich kontrolliert und die Sterberate über einen Zeitraum von 7 Tagen aufgezeichnet.

**5.2.2 Analyse der bakteriellen Ausbreitung auf die Organe der Maus nach subkutaner Applikation von *S. pyogenes* KTL3 und MR4.** Da die erhöhte Überlebensrate der mit *S. pyogenes* MR4 infizierten Tiere (III 5.2.1) möglicherweise mit einem langsameren Wachstum systemischer Bakterien zusammenhing, wurde die Bakterienzellzahl in den Organen infizierter C3H/HeN Mäuse bestimmt (V 11.2). Den Tieren wurde eine Dosis von jeweils  $2,5 \times 10^8$  KBE pro Maus von *S. pyogenes* KTL3 oder der *grab* Mutante MR4 subkutan injiziert und die Anzahl der Bakterien in Leber und Milz 24 h, 48 h und 72 h nach der Infektion bestimmt (Abb. 21). Die Ergebnisse zeigten während der ersten 48 h einen nahezu



identischen Verlauf der durch *S. pyogenes* KTL3 oder die Mutante verursachten systemischen Infektionen. Die Analyse nach 72 h ergab bei den mit *S. pyogenes* MR4 infizierten Mäusen eine Reduktion der Bakterienzellzahl in der Leber und Milz. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit dem *S. pyogenes* Wildtyp-Stamm KTL3 infizierten Mäusen ein progressives bakterielles Wachstum in den Organen beobachtet werden was auf eine Beteiligung von Protein GRAB am Infektionsprozess hinweist.

Potenzielle Revertanten von *S. pyogenes* MR4 Leber- und Milz- Isolaten wurden durch doppeltes Ausplattieren mit und ohne Kanamycin sowie Replika-Plattierung ausgeschlossen.

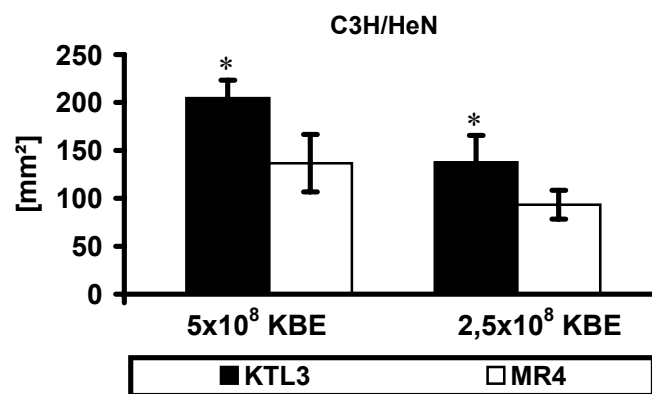


**Abb. 21: Systemische Ausbreitung der *S. pyogenes* Stämme KTL3 und MR4 nach subkutaner Infektion von C3H/HeN Mäusen.** Die Zahl der Bakterien in Leber (A) und Milz (B) infizierter C3H/HeN Mäusen wurde 24 h, 48 h, und 72 h nach Infektion mit einer Dosis von jeweils  $2,5 \times 10^8$  KBE des *S. pyogenes* Wildtyp Stamms KTL3 (■) oder der Mutante MR4 (●) bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert der log<sub>10</sub> KBE und wurde aus jeweils von fünf Tieren pro Gruppe gebildet. Die Standardabweichungen (STABW) sind als Balken dargestellt.

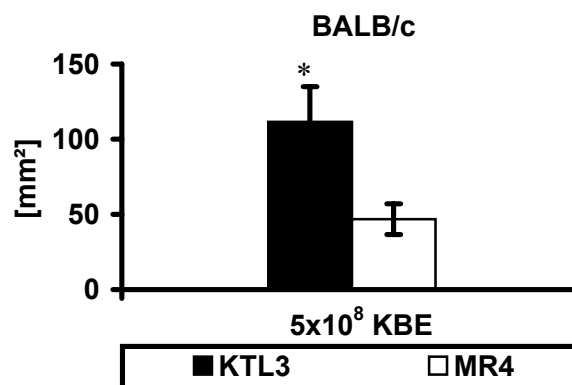
**5.2.3 Analyse der mit *S. pyogenes* KTL3 und MR4 induzierten Hautläsionen.** In diesem Versuch wurden Gruppen von jeweils zehn C3H/HeN und BALB/c Mäusen subkutan mit dem *S. pyogenes* Stamm KTL3 oder der Mutante MR4 infiziert (V 11.1). Die Entwicklung der Hautläsionen an der Einstichstelle wurde täglich in Bezug auf Größe und Ausbreitung dokumentiert. Bereits 24 h nach Infektion mit dem Pathogen konnte eine weiße, hochgradig

entzündete Fläche rund um die Injektionsstelle beobachtet werden. Die Infektion und die damit verbundene Ausweitung der lokalen Entzündung verliefen bei KTL3 infizierten Mäusen schneller als bei den MR4 behandelten Tieren. Die mit KTL3 infizierten Tiere entwickelten signifikant größeren Hautläsionen als die mit MR4 infizierte Gruppe (Abb. 22). Der beobachtete Effekt war unabhängig von der verabreichten Dosis ( $2,5 \times 10^8$  KBE bzw.  $5 \times 10^8$  KBE pro Maus) und wies auf eine verringerte Virulenz der *grab* Mutante MR4 hin (Abb. 22A). Um zu zeigen, dass der genetische Hintergrund der Tiere keinen Einfluss auf die beobachteten Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm KTL3 und der Mutante MR4 hat, wurde der Versuch auch an BALB/c Mäusen durchgeführt. Da die Tiere eine hohe Resistenz gegenüber GAS Infektionen aufwiesen, erfolgte die Infektion mit einer um den Faktor 2 höheren Dosis als bei C3H/HeN, mit  $5 \times 10^8$  KBE pro Maus. Ebenso wie bei C3H/HeN Mäusen führte die Infektion der BALB/c Mäuse mit der *grab* Mutante MR4 zu kleineren, flacheren Läsionen. Im Gegensatz dazu waren die durch den Wildtyp KTL3 verursachten Entzündungen tiefer und großflächiger. Die Ergebnisse sind in Abb. 22B abgebildet. In Abb. 22C sind die durch *S. pyogenes* KTL3 und MR4 verursachten Hautläsionen repräsentativ dargestellt.

**A**



**B**



**C**

**BALB/c KTL3**

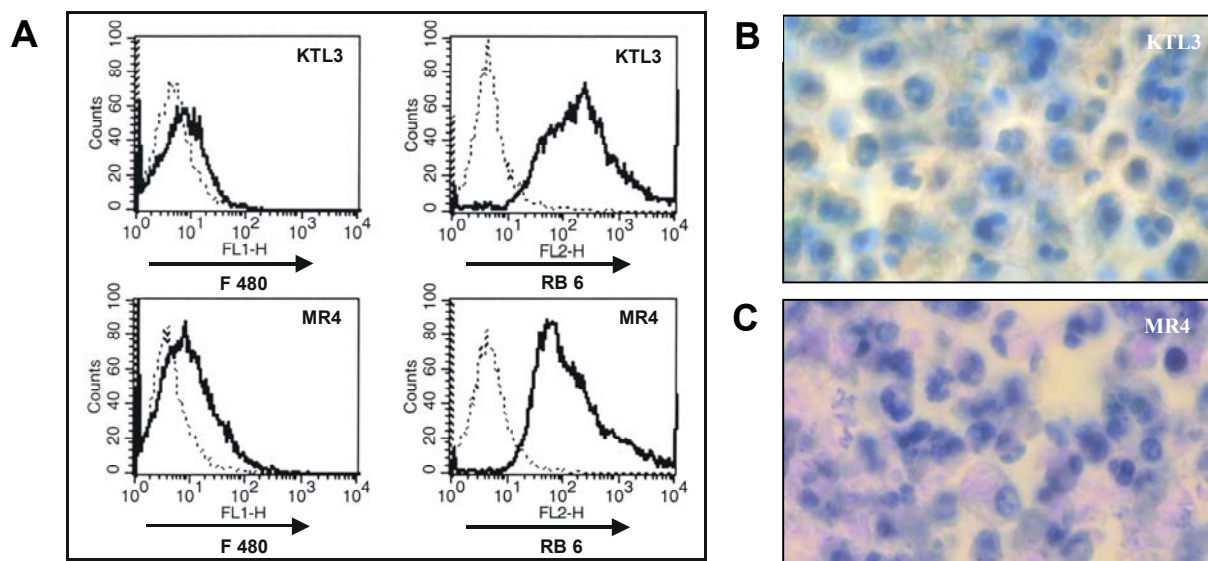


**BALB/c MR4**



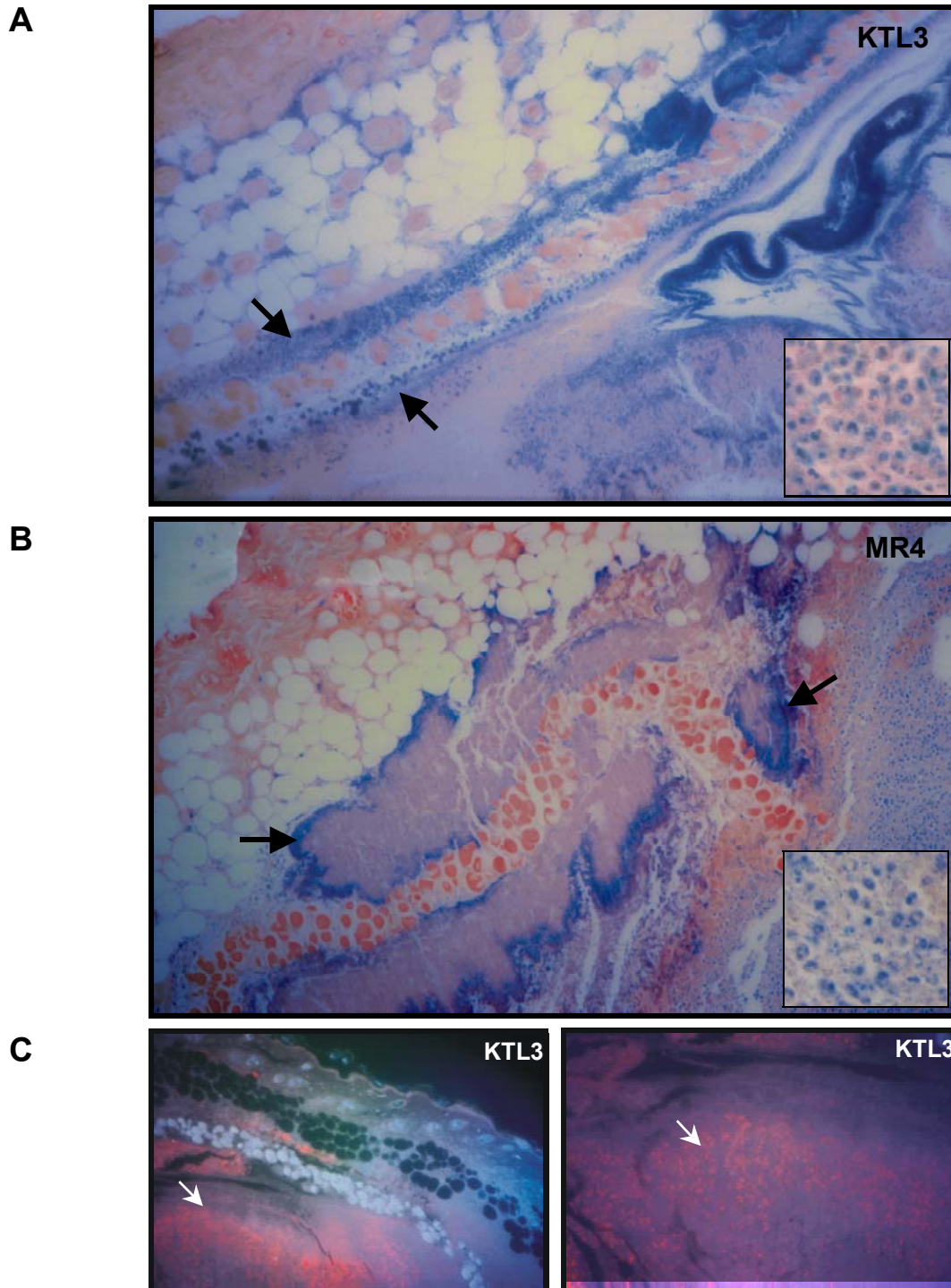
**Abb. 22: Vergleich der KTL3 und MR4 induzierten Hautläsionen.** *A*, Hautläsionen von C3H/HeN und *B*, von BALB/c Mäusen 48 h nach subkutaner Infektion mit *S. pyogenes* KTL3 (■) oder der *grab* Mutante MR4 (□). Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von jeweils zehn Tieren pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen KTL3 und MR4 infizierten Mäusen sind markiert mit (\*,  $P < 0,05$ ). Die in (*C*) dargestellten Fotografien zeigen Hautläsionen von BALB/c Mäusen fünf Tage nach subkutaner Applikation von *S. pyogenes* KTL3 (oberes Bild) bzw. der *grab* Mutante MR4 (unteres Bild).

**5.2.4 Histopathologie der Hautläsionen.** Die durch *S. pyogenes* verursachten Hautläsionen wurden histopathologisch untersucht. Ziel war es die Bakterien in der Kutis und Subkutis zu lokalisieren und Unterschiede zwischen *S. pyogenes* KTL3 und MR4 verursachten Läsionen aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurden BALB/c Mäuse mit jeweils  $5 \times 10^8$  KBE des Wildtypstamms KTL3 bzw. der Mutante MR4 subkutan infiziert und die entzündeten Hautsektionen 48 h nach Applikation der Bakterien für die histopathologische Untersuchung entnommen (V 12.1). Die Läsionen beider Gruppen waren durch eine starke inflammatorische Reaktion des infizierten Gewebes und eine massive Infiltration phagozytischer Zellen gekennzeichnet (Abb. 24 A, B unten rechts). Eine Analyse isolierter Phagozyten (V 11.3) mittels Durchflußzytometrie (V 10.3) ergab, dass es sich fast ausschließlich um polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) handelt (Abb. 23). Neben dem ausgeprägten Einstrom von PMNs war auf den histopathologischen Schnitten, sowohl bei den KTL3 (Abb. 24A) als auch den MR4 infizierten Mäusen (Abb. 24B), eine starke Ansammlung von Streptokokken an der Inokulationsstelle zu erkennen. Im Gegensatz zu der *S. pyogenes* Mutante MR4 hatte sich der Wildtypstamm KTL3 weitflächig über Epidermis, Dermis und Subkutis ausgebreitet und konnte in tiefer liegendes Gewebe eindringen (Abb. 24A). Durch die Mutante verursachte Läsionen waren kleiner und wurden durch eine dichte Schicht inflammatorischer Zellen lokal begrenzt. (Abb. 24B). Neben der Eosin/Azur Färbung (V 12.1.2) wurden die Bakterien zur Kontrolle mittels Immunfluoreszenz (V 12.1.3) unter Verwendung von anti-GAS spezifischen Antikörpern angefärbt (Abb. 24C)



**Abb. 23: Durchflußzytometrische Analyse inflammatorischer PMNs (RB6) und Makrophagen (F480).** A, Die PMNs und Makrophagen wurden 48 h nach Infektion von BALB/c Mäusen mit *S. pyogenes* KTL3 (oben) oder MR4 (unten) aus der Haut entnommen (durchgehende Linie). Inflammatorische Makrophagen wurden mit

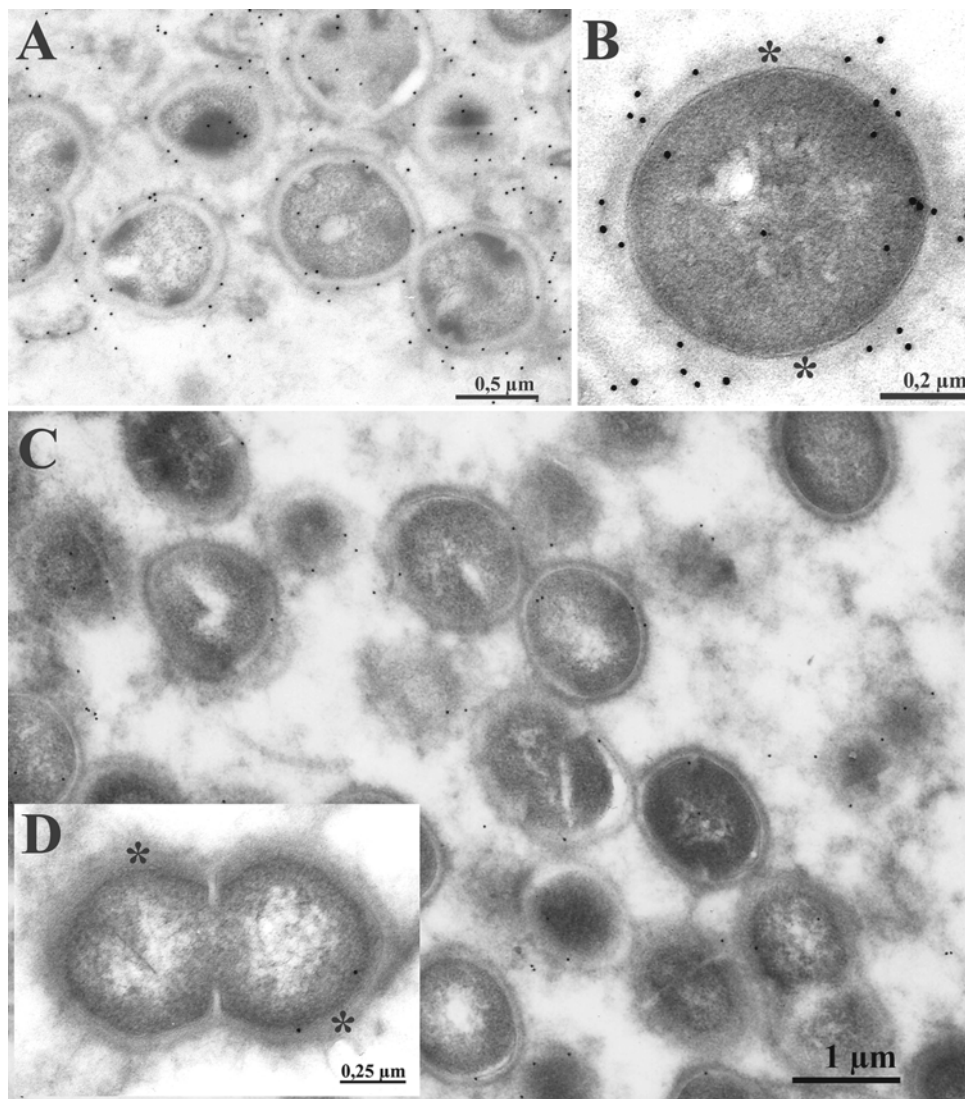
FITC-konjugierten anti-Maus F480 und PMNs mit PE-konjugierten anti-Maus RB6 Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Isotyp-passende Antikörper verwendet (gestrichelte Linie). **B**, PMNs von BALB/c Mäusen 48 h nach Infektion mit *S. pyogenes* KTL3. **C**, PMNs von BALB/c Mäusen 48 h nach Infektion mit *S. pyogenes* MR4.



**Abb. 24: Histopathologische Analyse dermalen Sektionen GAS infizierter BALB/c Mäuse.** Eosin/Azur gefärbte Hautsektionen (V 12.1.2) 48 h nach Infektion von BALB/c Mäusen mit *S. pyogenes* KTL3 (**A**) oder der *grab* Mutante MR4 (**B**). Die Pfeile deuten auf die Gruppe A Streptokokken. In den rechts unten eingefügten Bildern sind vergrößerte Aufnahmen inflammatorischer PMNs abgebildet. **C**, Lokalisation von GAS in Hautsektionen infizierter Mäuse mittels Immunfluoreszenz.



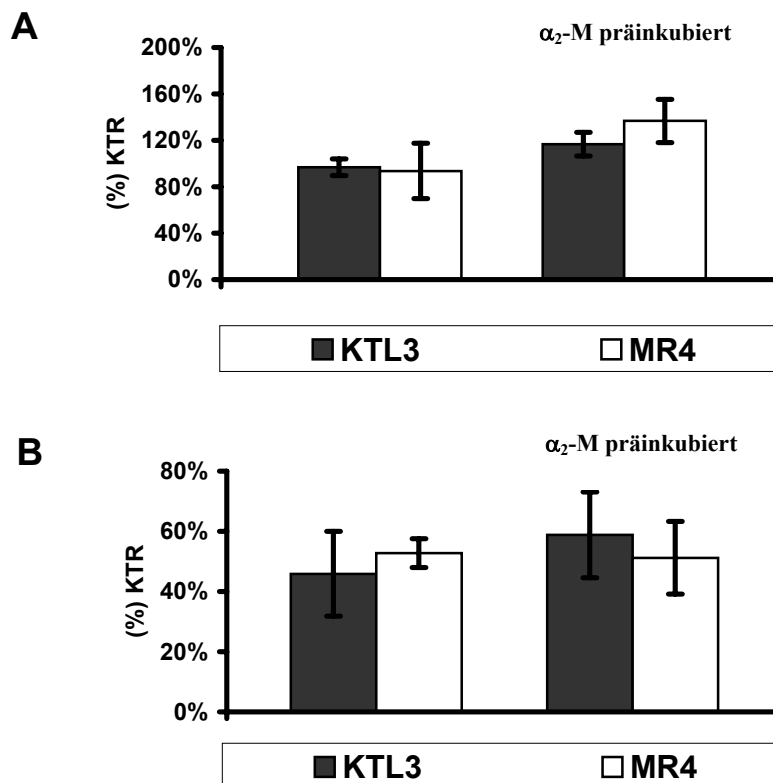
**5.2.5 Oberflächenlokalisierung von Protein GRAB in Hautsektionen GAS infizierter Mäuse.** Die Präsenz von Protein GRAB auf der Oberfläche von *S. pyogenes* KTL3 zum Zeitpunkt der Infektion wurde in der Elektronenmikroskopie bestätigt. Der Nachweis erfolgte an Hautpräparaten aus BALB/c Mäusen mit anti-rGRAB Antikörpern und goldmarkiertem Protein A (V 12.2). Die Hautsektionen wurden von 48 h zuvor mit *S. pyogenes* KTL3 bzw. MR4 infizierten Tieren entnommen. Protein GRAB konnte auf der bakteriellen Oberfläche von *S. pyogenes* KTL3 (Abb. 25A, B) nicht aber auf der Oberfläche der *grab* Mutante MR4 nachgewiesen werden (Abb. 25C, D). Die in ihrer Virulenz attenuierte Mutante ist frei von GRAB während der Wildtypstamm KTL3 das  $\alpha_2$ -M bindende Protein auf seiner Oberfläche präsentiert.



**Abb. 25: Oberflächenlokalisierung von GRAB in Hautsektionen KTL3 und MR4 infizierter BALB/c Mäuse.** Die Haut der GAS infizierten BALB/c Mäuse wurde 48 h nach Inokulation mit *S. pyogenes* KTL3 (A-B) bzw. der *grab* Mutante MR4 (C-D) entnommen. Protein GRAB wurde mittels anti-rGRAB IgG nachgewiesen. Die bakterielle Kapsel ist mit (\*) gekennzeichnet.

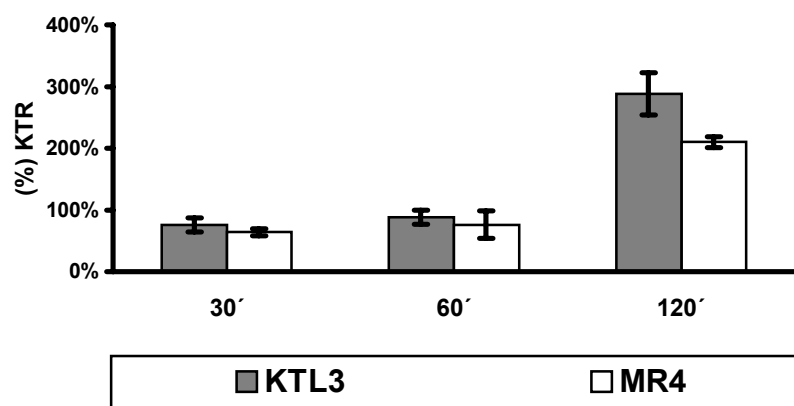
### 5.3 Bakterizidietest mit isolierten PMNs aus der Maus.

Die bisherigen Ergebnisse (III 5.2) zeigten, dass die *grab* Mutante MR4 im Vergleich zu dem GRAB exprimierenden Wildtypstamm KTL3 in ihrer Virulenz attenuiert ist. Da die Hautinfektionen durch einen massiven Einstrom polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet sind (III 5.2.4), sollte die Resistenz der *S. pyogenes* Stämme KTL3 und MR4 gegenüber PMN vermittelter Phagozytose getestet werden, um festzustellen ob die verringerte Virulenz von *S. pyogenes* MR4 auf eine verminderte Resistenz gegenüber invadierenden inflammatorischen Zellen zurückzuführen ist. Dazu wurde die Überlebensrate der Bakterien in Anwesenheit ruhender (Abb. 26A) und PMA-aktivierter (Abb. 26B) intraperitonealer PMNs aus der Maus verglichen (V 10.4.3). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl KTL3 als auch MR4 eine ähnlich hohe Resistenz gegenüber phagozytierenden PMNs besitzen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stämmen festgestellt werden.

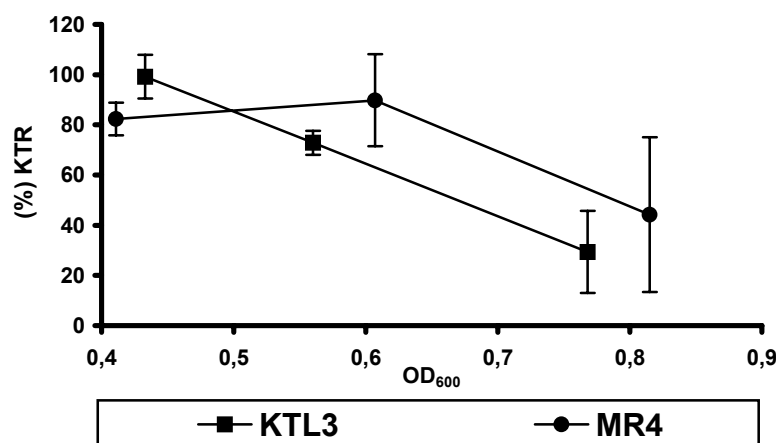


**Abb. 26: Resistenz von *S. pyogenes* KTL3 und MR4 gegenüber PMN vermittelter Phagozytose.** Bakterizidietest mit **A**, ruhenden und **B**, PMA-aktivierten intraperitonealen PMNs. Die mit  $\alpha_2$ -M präinkubierten und unbehandelten Bakterien wurden zusammen mit den PMNs über einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der KBE durch Ausplattieren serieller Verdünnungen bestimmt. Diese wurden mit einem PMN freien ansonsten identischen Kontrollansatz verglichen und als prozentualer Anteil der Kontrolle (KTR) dargestellt.

**5.3.1 Modifizierter Lancefield Assay.** Der *S. pyogenes* Wildtypstamm KTL3 und die *grab* Mutante MR4 wurden hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit in frischem humanem Blut von drei unterschiedlichen Spendern getestet (V 10.4.4). Dazu wurden die Bakterien während der frühen exponentiellen Wachstumsphase Phase ( $OD_{600}$  0,3-0,4) entnommen und für 0,5-2,0 h in heparinisiertem Blut inkubiert (Abb. 27). In einem zweiten Versuch wurde die Überlebensfähigkeit von Bakterien unterschiedlicher Wachstumsphasen überprüft (Abb. 28). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl KTL3, als auch die Mutante MR4 in der Lage sind in humanem Blut zu überleben und sich zu teilen. Dabei wies der Wildtypstamm KTL3 eine schnellere Wachstumsrate auf als die Mutante (Abb. 27). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stämmen hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit in humanem Blut festgestellt (Abb. 28).



**Abb. 27: Wachstumskinetik von KTL3 und der *grab* Mutante MR4 in menschlichem Blut.** Die Bakterien wurden der frühen exponentiellen Phase entnommen und über einen Zeitraum von 30' – 120' min in frischem, heparinisiertem, humanem Blut inkubiert. Die KBE wurden durch Ausplattieren serieller Verdünnungen bestimmt und die Ergebnisse als prozentualer Anteil des ursprünglich eingesetzten Inokulums dargestellt.



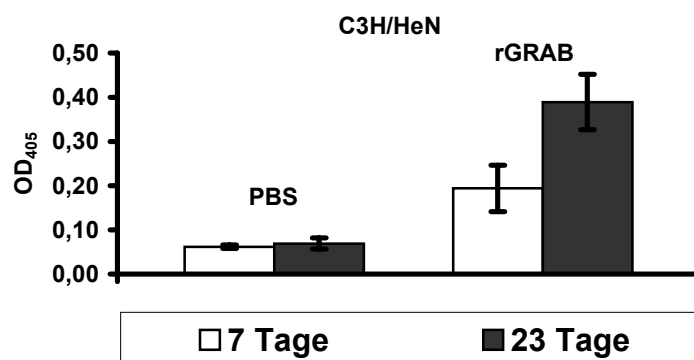
**Abb. 28: Überlebensfähigkeit von *S. pyogenes* KTL3 und der *grab* Mutante MR4 aus verschiedenen Wachstumsphasen in humanem Blut.** Die Bakterien wurden während der frühen exponentiellen



(OD<sub>600</sub> ~ 0,3-0,4), frühen stationären (OD<sub>600</sub> ~0,6) und der stationären Phase (OD<sub>600</sub> ~0,8) entnommen und für 1 h in heparinisiertem, humanem Blut inkubiert. Die KBE wurden durch Ausplattieren serieller Verdünnungen bestimmt und die Ergebnisse als prozentualer Anteil des ursprünglich eingesetzten Inokulums dargestellt.

## 5.4 Immunisierung von C3H/HeN Mäusen mit rGRAB

Im Hautinfektionsmodells an der Maus konnte gezeigt werden, dass oberflächenassoziiertes Protein GRAB zur bakteriellen Virulenz von *S. pyogenes* beiträgt. Das GRAB kodierende Gen konnte in allen Klinischen GAS Isolaten nachgewiesen werden und ist in seiner Sequenz hoch konserviert. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen die Eignung von GRAB als potentiell Vakzin untersucht. Dazu wurden Gruppen von je 10 C3H/HeN Mäusen unter Verwendung von rGRAB als Antigen (Tab. 7) bzw. PBS als Kontrolle, immunisiert (V 10.1.2). Die Präsenz anti-rGRAB spezifischer Antikörper in den Seren immunisierter Tiere wurde mittels ELISA bestimmt (V 10.2). Die Ergebnisse zeigten, dass alle mit Protein rGRAB immunisierten Tiere eine starke Immunantwort gegen das verabreichte bakterielle Antigen entwickelten, während die mit PBS behandelten Kontrollgruppe keine Reaktion zeigte (Abb. 29).

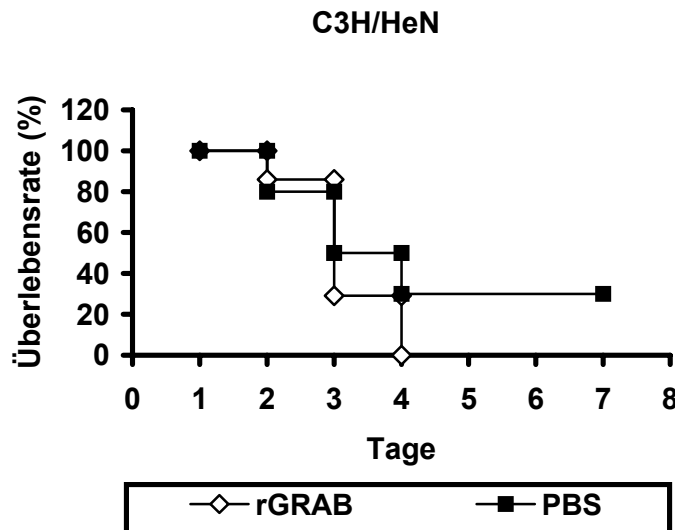


**Abb. 29: Prävalenz von antigenspezifischem anti-rGRAB IgG nach Immunisierung von C3H/HeN Mäusen mit rGRAB.** Alle Ergebnisse wurden aus jeweils 5 Tieren gemittelt wobei der Nachweis mit rGRAB beschichteten Platten, 1:50 verdünnten Serumproben und biotinylierten anti-Maus IgG (Tab. 8) erfolgte.

### 5.4.1 Protektion rGRAB immunisierter C3H/HeN Mäuse gegenüber *S. pyogenes* KTL3.

Die protektive Eigenschaft der gegen rGRAB generierten Immunantwort wurde im Hautinfektionsmodell an C3H/HeN Mäusen getestet. Es wurden Gruppen von jeweils 10 C3H/HeN Mäusen mit rGRAB bzw. PBS als Kontrolle immunisiert (Abb. 29). Anschließend wurden die immunisierten Mäuse mit dem GRAB exprimierenden *S. pyogenes* Wildtypstamm KTL3 subkutan mit einer Dosis von  $2,5 \times 10^8$  KBE pro Maus infiziert (V 11.1). Die

Überlebensrate der Tiere wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich dokumentiert (Abb. 30). Obwohl die Tiere eine positive Immunantwort auf das bakterielle Antigen entwickelt hatten, wurde die Überlebensrate gegenüber der PBS-Kontrollgruppe nicht verbessert. Ein Vergleich der Läsionen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 30: Überlebensrate rGRAB und PBS immunisierter C3H/HeN Mäuse nach subkutaner Infektion mit *S. pyogenes* KTL3.** Es wurden zwei Gruppen von jeweils 10 C3H/HeN Mäusen mit dem bakteriellen Antigen rGRAB bzw. PBS als Kontrolle immunisiert und die Prävalenz anti-rGRAB gerichteter Antikörper nach 23 Tagen bestimmt (Abb. 29). Die immunisierten Tiere wurden anschließend im Hautinfektionsmodell mit dem *S. pyogenes* Wildtypstamm KTL3 infiziert und die Überlebensrate über einen Zeitraum von 7 Tagen dokumentiert.

### 5.5 Analyse der $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von *S. pyogenes* KTL3 im Verlauf der systemischen Infektion

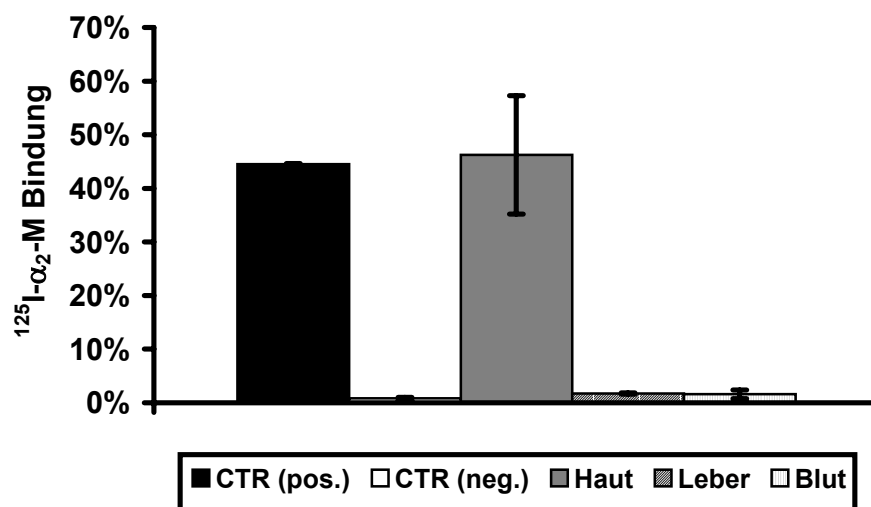
Die vorhergehenden Versuche zeigten, dass die Immunisierung von C3H/HeN mit rGRAB keine protektive Immunantwort gegenüber *S. pyogenes* KTL3 vermittelt. Aus diesem Grund wurde die Präsenz von Protein GRAB auf der bakteriellen Oberfläche von KTL3 im Verlauf der Infektion untersucht.

Für den Nachweis wurden die Bakterien aus der Haut, dem Blut und der Leber 48 h nach der Infektion von C3H/HeN Mäusen mit *S. pyogenes* KTL3, isoliert (V 11.4) und die  $^{125}\text{I}$ -  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität der isolierten Streptokokken untersucht. Als Vergleich wurden THY

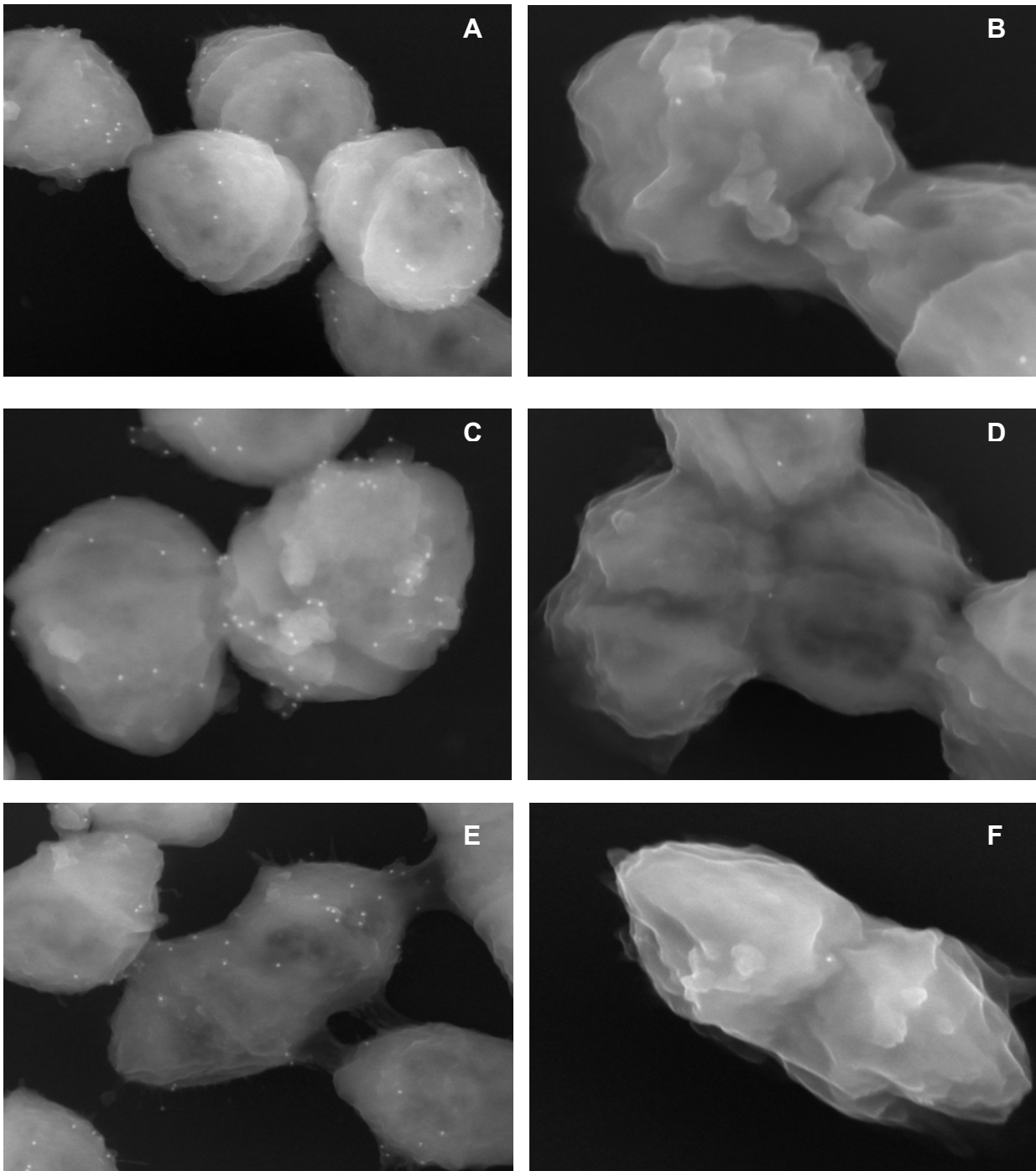
Kulturen von *S. pyogenes* KTL3 verwendet. Die *grab* Mutante MR4 diente als negativ Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigten, dass die  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von *S. pyogenes* KTL3 in Abhängigkeit von dem infizierten Gewebe variiert. Aus der Haut entnommene Isolate verhielten sich nahezu identisch zur der THY-Kontrolle. Im Gegensatz dazu hatten die aus dem Blut und der Leber entnommenen KTL3 Bakterien ihre Bindungsaktivität drastisch reduziert was auf einen Verlust von Protein GRAB hindeutete (Abb. 31).

Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurde neben den funktionellen Bindungsstudien mit  $^{125}$ I-markiertem  $\alpha_2$ -M die Verfügbarkeit von Protein GRAB auf der Oberfläche der reisolierten KTL3 Stämme, direkt mittels anti-rGRAB gerichteter Antikörper im FESEM überprüft (V 12.2.1). GRAB konnte nur auf der Oberfläche von KTL3 Hautisolaten nicht aber auf der Oberfläche von Blutisolaten nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Ergebnisse der  $^{125}$ I- $\alpha_2$ -M Bindungsstudien (Abb. 32). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Protein GRAB bzw. die Oberflächenlokalisierung während der Infektion in Abhängigkeit vom umgebenden Wirtsgewebe stark reguliert wird.



**Abb. 31:**  $^{125}$ I- $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität von *S. pyogenes* KTL3 Bakterien die aus der Haut, dem Blut bzw. der Leber infizierter C3H/HeN Mäuse isoliert wurden. Fünf Tiere pro Gruppe wurden mit jeweils  $2,5 \times 10^8$  KBE von *S. pyogenes* KTL3 infiziert und die Bakterien 48 h nach Injektion aus dem Blut, der Leber und der Haut isoliert. Die isolierten Bakterien wurden hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität getestet. Als Kontrolle wurden THY-Kulturen von KTL3 (■) und der Mutante MR4 (□) verwendet. In der Abbildung wurden repräsentativ die Ergebnisse aus einem von fünf unabhängigen Versuchen dargestellt. Standardabweichungen sind als Balken dargestellt.



**Abb. 32: Oberflächenlokalisation von Protein GRAB auf *S. pyogenes* KTL3 Bakterien die aus der Haut bzw. dem Blut einer GAS infizierten C3H/HeN Maus isoliert wurden. A, C, E *S. pyogenes* KTL3 Hautisolat; B, D, E, *S. pyogenes* KTL3 Blutisolat einer 48 h zuvor mit  $2,5 \times 10^8$  KBE infizierten C3H/HeN Maus. Der Nachweis von oberflächengebundenem Protein GRAB erfolgte mittels anti-rGRAB IgG und wurde parallel an drei verschiedenen Tieren durchgeführt.**

## IV. Diskussion

Gruppe A Streptokokken (GAS) sind humanpathogene meist extrazellulär vorkommende Erreger, die in der Lage sind eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen auszulösen. Diese können von einer nicht invasiven Kolonisierung der Rachenepithelien im oberen Respirationstrakt und der Haut bis hin zu schwerwiegenden invasiven Erkrankungen der tiefer liegenden Gewebeschichten führen, oftmals einhergehend mit Sepsis oder toxischem Schock (STSS) (Bisno *et al.*, 1996; Stevens, 1995). Das vermehrte Auftreten von STSS in den letzten Jahren sowie die weltweite Zunahme invasiver Erkrankungen wie der Nekrotisierenden Fasciitis (NF) und Zellulitis ist besorgniserregend, zumal ihre Ursache bis heute nicht geklärt werden konnte (Stevens, 1999; Kaul *et al.*, 1997). Es ist daher erforderlich neben den bisherigen Ansätzen, wie der Antibiotikatherapie, neue Wege zur Behandlung und Prophylaxe zu etablieren, wobei das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung eines Impfstoffes liegt. Viele Aspekte, die zur Ausbildung einer Infektion führen sind bislang noch nicht eindeutig geklärt. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse bakterielle Strukturen, welche an einer Interaktion mit dem Wirt beteiligt sind und somit die Etablierung als auch die Ausbreitung des Erregers vermitteln, aufzuklären und ihre Eignung als potentielle Impfstoffkandidaten zu testen.

*S. pyogenes* besitzt die Fähigkeit die unterschiedlichsten Gewebe zu kolonisieren, um dort entweder als unbemerkter Kommensale zu überdauern oder unter entsprechenden Bedingungen eine Infektion hervorzurufen. Dabei spielen insbesondere bakterielle Virulenzfaktoren aber auch physiologische und möglicherweise genetische Prädispositionen des Wirtes eine Rolle. Um dieses zu erreichen bedienen sich die Erreger eines komplexen Spektrums verschiedener Faktoren wie z. B. Fibronectin-, Kollagen-, Fibrinogen- oder Vitronectin bindender Proteine, die ihnen eine direkte Kolonisierung ermöglichen (Referenzen siehe Cunningham, 2000; Navarre *et al.*, 1999) oder wie im Fall von SpeB eine Ausbreitung durch Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) erleichtern (Collin *et al.*, 2003; Saouda *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2000). Andere Bestandteile wie das M-Protein (Fischetti, 1989; Lancefield, 1962), die Hyaluronsäurekapsel (Hynes *et al.*, 1995) oder die C5a Peptidase (Cleary *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1990), tragen dazu bei den Mechanismen der wirtseigenen Immunabwehr zu umgehen, indem sie die Erreger vor Phagozytose und zellvermittelter Lyse bewahren oder den Ablauf der Komplementkaskade verlangsamen. Des Weiteren sind GAS in der Lage direkt mit wirtseigenen Komponenten wie z. B. Plasminogen zu interagieren und somit die enzymatische Funktion von Plasmin für die Durchquerung der

ECM zu nutzen (Li *et al.*, 1999; Christner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995; 1995; 1994; Tewodros *et al.*, 1994) oder durch Aktivierung wirtseigener Matrix-Metallotyp-Proteasen (MMPs) den Abbau der ECM zu beschleunigen (Burns Jr. *et al.*, 1996). Neben ihrer Fähigkeit zur Bindung und Aktivierung von Proteasen sind GAS in der Lage den wirtseigenen Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ -M) zu binden (Rasmussen *et al.*, 1999; Chhatwal *et al.*, 1987; 1983).  $\alpha_2$ -M ist ein ca. 725 kDa großes homoterares Plasmaprotein, das die Fähigkeit besitzt nahezu alle Klassen von Endoproteasen unabhängig von ihrem Ursprung (endo- oder exogen) über einen bislang einzigartigen Mechanismus einzufangen und aus dem Blutstrom zu entfernen. Die eingeschlossenen Proteasen verbleiben dabei aktiv werden jedoch sterisch an der Umsetzung größerer Substrate gehindert (Moncino *et al.*, 1991; Sottrup-Jensen *et al.*, 1984).

GAS sind ausschließlich in der Lage freies, nicht mit Proteasen komplexiertes  $\alpha_2$ -M (slow-form  $\alpha_2$ -M) zu binden. Die Bedeutung dieser Interaktion für den Infektionsprozess ist bislang unbekannt. Die Fähigkeit ein so multifunktionelles Protein wie  $\alpha_2$ -M zu binden legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der  $\alpha_2$ -M Bindung durch *S. pyogenes* um einen Virulenz unterstützenden Mechanismus handelt. Einerseits wurde postuliert, dass die Bindung von slow-form  $\alpha_2$ -M mit einer Konformationsänderung des Inhibitors verbunden ist, welche die Rezeptorvermittelte Phagozytose der Erreger durch Polymorphkernige Granulozyten (PMNs) verstärkt (Valentin-Weigand *et al.*, 1990). Die Funktion dieser Interaktion ist jedoch unklar, da *S. pyogenes* durch eine Vielzahl von antiphagozytischer Faktoren wie dem M-Protein eben dieses zu umgehen versucht. Andererseits wurde gezeigt, dass die Bindung von  $\alpha_2$ -M an bakterielle Oberflächenproteine keinen Einfluss auf dessen Aktivität hat und somit weiterhin in der Lage ist Proteasen zu inhibieren (Rasmussen *et al.*, 1999). Diese Art der Interaktion mit  $\alpha_2$ -M bietet GAS die Möglichkeit die vielfältigen Funktionen von  $\alpha_2$ -M zu nutzen und für die Regulation eigener proteolytischer Prozesse einzusetzen. Dabei spielt die Sekretion der bakteriellen Cystein-Protease SpeB eine wichtige Rolle. SpeB ist neben einer direkten Spaltung der ECM in der Lage wirtseigene Enzyme wie die MMP's zu aktivieren oder Inflammatorische Prozesse auszulösen, welche eine massive Freisetzung weiterer Proteasen und Sauerstoffradikale nach sich ziehen. Dieser Vorgang lässt sich insbesondere bei lokalen Infektionen der Haut beobachten, die durch eine extensive Infiltration Polymorphkerniger Granulozyten (PMNs) und starken Serumeinstrom gekennzeichnet ist (Robert *et al.*, 1999; Smith, 1994; Weiss, 1989). Die Aktivierung dieser Vielzahl von proteolytischen Enzymen führt einerseits zu einer starken Gewebsdegradation, wodurch invadierenden GAS eine Ausbreitung auf die umgebenden Bereiche erleichtert wird, schädigt jedoch andererseits die

bakteriellen Oberflächenstrukturen wie z. B. das M-Protein, das den Erreger vor Phagozytose schützen soll. Die Fähigkeit von *S. pyogenes* einen Proteaseinhibitor wie  $\alpha_2$ -M zu binden stellt somit möglicherweise, neben der C5a Peptidase oder der M-Protein vermittelten Bindung von Faktor H (Johnsson *et al.*, 1998), einen weiteren potentiellen Schutzmechanismus dar, der es *S. pyogenes* ermöglicht in einem aggressiven Milieu wie z. B. der Haut zu bestehen.

Diese Annahme wird durch die folgenden Ergebnisse gestützt. Die Fähigkeit mit  $\alpha_2$ -M zu interagieren ist innerhalb der GAS weit verbreitet, wobei aus Hautinfektionen stammende klinische Isolate den größten Anteil ausmachen. Es scheint, dass die Bindung von  $\alpha_2$ -M in einer Protease reichen Umgebung wie der Haut für den Erreger von Vorteil ist bzw. das Milieu der Haut die Expression von Bindungsproteinen positiv beeinflusst. Bisherige Versuche zur Isolierung  $\alpha_2$ -M bindender Proteine resultierten in der Identifizierung von Protein GRAB (protein G-related  $\alpha_2$ -M binding protein), einem ca. 22,8 kDa großen Oberflächenprotein von *S. pyogenes*. GRAB ist zur Zeit das einzige beschriebene  $\alpha_2$ -M bindende Protein von *S. pyogenes* und wurde anhand von Sequenzhomologien der  $\alpha_2$ -M bindenden Domäne zu Protein G identifiziert (Rasmussen *et al.*, 1999). Inhibitionsstudien an dem  $\alpha_2$ -M bindenden GAS Isolat KTL3 ergaben zwei unterschiedliche Bindungsstellen. Eine mit hoher ( $K_a = 2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) und die Andere mit niedriger Affinität ( $K_a = 5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), was auf die Präsenz eines weiteren putativen Bindungsproteins schließen ließ (Rasmussen *et al.*, 1999). Basierend auf diesen Ergebnissen, mit der Absicht die zweite  $\alpha_2$ -M Bindungsstelle näher zu charakterisieren wurden kompetitive Inhibitionsstudien an ausgewählten klinischen GAS Isolaten durchgeführt und die Prävalenz von *grab* innerhalb der GAS untersucht. Die Inhibitionsstudien ergaben, wie bereits für KTL3 gezeigt, zwei unterschiedliche  $\alpha_2$ -M Bindungsstellen und bestätigten die Ergebnisse der vorhergehenden Studie. Des weiteren konnte das GRAB kodierende Gen in allen getesteten Isolaten ( $n = 126$ ) nachgewiesen werden. Die Anzahl der Wiederholungssequenzen in *grab* hatte keinen Einfluss auf die Bindungsstärke. Versuche zur Isolierung neuer  $\alpha_2$ -M Bindungsproteine mittels Affinitätschromatographie verliefen negativ. Mit Ausnahme von Protein GRAB konnte kein weiterer Bindungspartner isoliert und identifiziert werden. Eine spätere Analyse der  $\alpha_2$ -M Bindungsdomäne in GRAB ergab zwei unterschiedliche Bindungsmotive, welche die Interaktion mit  $\alpha_2$ -M vermitteln und die Ergebnisse der Inhibitionsstudie erklären. Protein GRAB ist somit das einzige funktionelle  $\alpha_2$ -M bindende Protein von *S. pyogenes*. Die Tatsache, dass eine Deletion von Protein GRAB bei der GAS Mutante MR4 zu einem

vollständigen Bindungsverlust führte (Rasmussen *et al.*, 1999) bestätigt dies und zeigt zudem, dass die Rate an unspezifischen Hintergrundbindungen von  $\alpha_2$ -M an *S. pyogenes* sehr gering ist.

Um eine Beteiligung von GRAB am Infektionsprozess als potenzieller Virulenzfaktor nachzuweisen wurden ELISA Studien mit Seren rekonvaleszenter GAS infizierter Patienten durchgeführt. Nahezu alle getesteten Seren enthielten im Vergleich zur Negativkontrolle anti-GRAB Antikörper, wodurch die Präsenz dieses Proteins auf der bakteriellen Oberfläche zum Zeitpunkt der Infektion belegt wird. Ein Großteil der positiv getesteten Seren stammte von Pyodermiepatienten, was mit den Ergebnissen der  $^{125}\text{I}$ - $\alpha_2$ -M Bindungsstudie korreliert und erneut auf eine gesteigerte Expression von Protein GRAB während der Infektion Protease reicher Umgebungen wie der Haut hindeutet. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass häufig mehrere GAS Stämme an einer Erkrankung beteiligt sind und die Aufeinanderfolge verschiedener Infektionen innerhalb kurzer Zeit nicht ausgeschlossen werden kann.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Verlauf dieser Arbeit der Einfluss von Protein GRAB auf den Infektionsprozess in einem Hautinfektionsmodell an der Maus näher untersucht. Dabei wurde der GRAB exprimierende *S. pyogenes* Wildtypstamm (KTL3) mit der zugehörigen GRAB-defizienten Mutante (MR4) verglichen. Die Mutation von MR4 besteht in einer Deletion des Membranankers wodurch das Protein nicht mehr in der Zellwand verankert werden kann und stattdessen an das umgebende Medium sezerniert wird. Durch intraperitoneale Vergabe beider Stämme an NMRI Mäuse konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutante weniger virulent als der Wildtyp ist (Rasmussen *et al.*, 1999). Aufgrund des gewählten Modells war es jedoch nicht möglich Rückschlüsse auf den Infektionsverlauf zu ziehen. Um eine tatsächliche Beteiligung von Protein GRAB als Virulenzfaktor nachzuweisen war es daher notwendig ein geeignetes Modell zu etablieren, dass eine bessere Dokumentation der Infektion erlaubt, den Bedingungen einer natürlichen Infektion beim Menschen möglichst nahekommt und die Expression von Protein GRAB positiv beeinflusst. Die Tatsache, dass insbesondere aus Hautinfektionen stammende GAS Isolate hohe  $\alpha_2$ -M Bindungseigenschaften aufweisen ließen daher das Hautinfektionsmodell an der Maus geeignet erscheinen, um den Einfluss von Protein GRAB auf die bakterielle Virulenz zu untersuchen.

Zur Etablierung des Modells wurden zunächst der *S. pyogenes* Wildtypstamm KTL3 als auch die GRAB depletierte Mutante MR4 hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in Kulturmedium verglichen, wobei sich beide Stämme MR4 und KTL3 nahezu identisch verhielten. Die Mutagenese von GRAB scheint das Wachstum und die Morphologie der Mutante MR4 nicht negativ beeinflusst zu haben. Da *grab* nicht konstitutiv exprimiert wird



und die Transkription nur im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt (Rasmussen *et al.*, 1999) war es notwendig die Bedingungen für die Infektionen auf die Expression des Proteins abzugleichen, um den Einfluss von GRAB untersuchen zu können. Zur Kontrolle durchgeführte elektronenmikroskopische Aufnahmen der Bakterien in der Haut zum Zeitpunkt der Infektion, als auch Bindungsstudien mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem  $\alpha_2\text{-M}$  bestätigten die Präsenz von GRAB auf der bakteriellen Oberfläche von KTL3, nicht aber der Mutante MR4. MR4 ist frei von oberflächengebundenem GRAB und somit nicht mehr in der Lage mit  $\alpha_2\text{-M}$  zu interagieren. Die subkutane Infektion von Mäusen mit dem  $\alpha_2\text{-M}$  bindenden *S. pyogenes* Stamm KTL3 oder der GRAB defizienten Stamm MR4 zeigte schließlich, dass die Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm deutlich in ihrer Virulenz attenuiert ist. So waren die durch MR4 verursachten Hautläsionen signifikant kleiner, die Zahl der Bakterien in Leber und Milz geringer und die Tiere überlebten länger. Der Effekt konnte sowohl an C3H/HeN Mäusen als auch den weitaus resistenteren BALB/c Mäusen gezeigt werden, wodurch eine Beeinflussung durch den genetischen Hintergrund der Tiere ausgeschlossen werden konnte (Goldmann *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2001).

Der Grund warum die Bindung von  $\alpha_2\text{-M}$  an die bakterielle Oberfläche den Erregern einen Überlebensvorteil verschafft ist aufgrund der vielfältigen Funktionen von  $\alpha_2\text{-M}$  bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es kann spekuliert werden, dass die Interaktionen auf der einen Seite dazu dient den Proteaseinhibitor  $\alpha_2\text{-M}$  aus dem umgebenden Medium zu entfernen, und die Funktion der bereits aktivierten Proteasen für eine effizientere Ausbreitung im Gewebe zu nutzen, oder auf der anderen Seite, um eigene Oberflächenproteine vor einer proteolytischen Spaltung zu bewahren. Die Tatsache, dass GAS ausschließlich aktives, nicht mit Proteasen komplexiertes  $\alpha_2\text{-M}$  bindet unterstreicht diese Hypothese (Chhatwal *et al.*, 1987; 1983). Aufgrund der Mutation ist die *S. pyogenes* Mutante MR4 nur noch in der Lage Protein GRAB zu sekretieren, kann es aber nicht mehr in seiner Zellwand verankern. Es ist anzunehmen, dass der Überlebensvorteil von KTL3 gegenüber der Mutante MR4 durch die Präsenz von Protein GRAB auf der bakteriellen Oberfläche vermittelt wird. Durch die Bindung von  $\alpha_2\text{-M}$  an GRAB wird die proteolytische Spaltung von Oberflächenproteinen wie z.B. dem antiphagozytischen M-Protein vermindert. Die Oberflächenproteine von MR4 sind dagegen einer Vielzahl von Proteasen ungeschützt ausgesetzt, was zu einer erhöhten Phagozytose der Mutante durch invadierende PMNs am Ort der Infektion führt. Diese These wird zusätzlich dadurch belegt, dass die Expression von GRAB, parallel zu dem antiphagozytischen M-Protein und der C5a Peptidase, in der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt, während die der bakteriellen Cysteinprotease SpeB in der stationären Phase stattfindet (Referenzen siehe

Rasmussen *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit ist, dass GRAB über die Bindung von  $\alpha_2$ -M in der Lage ist mit den Zellen des Wirtseigenen Immunsystems zu interagieren und durch proteolytische Spaltung von z.B. IL-2 die Entwicklung der inflammatorischen Prozesse beeinflusst (Mettenburg *et al.*, 2002; Garber *et al.*, 2000; Borth, 1994).

Die Bestätigung von Protein GRAB, dem einzigen  $\alpha_2$ -M Bindungsprotein von *S. pyogenes* als Virulenzfaktor und die Tatsache, dass das GRAB kodierende Gen in allen Stämmen vorhanden ist machen es somit zu einem potenziellen Kandidaten für ein Vakzin gegen GAS. Bislang wurden verschiedene bakterielle Proteine wie M-Protein, Cystein Protease (Kapur *et al.*, 1994), C5a Peptidase (Ji *et al.*, 1995), das Fibronektin bindenden Protein SfbI (Medina *et al.*, 1998, Schulze *et al.*, 2003) oder SOF (Courtney *et al.*, 2003) mit unterschiedlichem Erfolg im Tiermodell getestet, wobei das M-Protein aufgrund seiner Fähigkeit eine protektive Immunantwort zu vermitteln lange Zeit als vielversprechender Kandidat betrachtet wurde. Die hohe Heterogenität innerhalb der GAS mit mittlerweile über hundert verschiedenen Serotypen, sowie das Auftreten von Kreuzreaktionen M-Protein-spezifischer Antikörper mit wirtseigenem Myosin erschweren jedoch einen Einsatz als Vakzin (Brand *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 1997; Guilherme *et al.*, 1995; Pruksakorn *et al.*, 1994; Dale *et al.*, 1985; Manjula, *et al.*, 1985).

Um die Eignung von Protein GRAB zu testen, wurden Immunisierungsstudien an Mäusen durchgeführt, in denen rGRAB intraperitoneal verabreicht wurde. Alle immunisierten Tiere entwickelten im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe eine positive Immunantwort auf das verabreichte Antigen. Es war jedoch nicht möglich die Überlebensrate von rGRAB immunisierten Tieren gegenüber der PBS Kontrollgruppe, bei Infektion mit *S. pyogenes* KTL3, zu verbessern. Beide entwickelten ähnlich große Hautläsionen und wiesen eine vergleichbare Bakterienzellzahl in der Leber, der Milz und der Haut auf. Da die Expression von GRAB durch *S. pyogenes* nicht konstitutiv erfolgt, kann spekuliert werden, dass die Expression im Verlauf der verschiedenen Infektionsstadien, wenn der Erreger dem wirtseigenen Immunsystem voll ausgesetzt ist, bzw. während der Ausbreitung von der lokalen Infektionsstelle über das Blut hinweg, herunter reguliert wird und GRAB somit für die Immunabwehr nicht länger zugänglich ist.

Um die zweite Hypothese zu testen, wurden C3H/HeN Mäuse zunächst mit dem *S. pyogenes* Stamm KTL3 infiziert und die Bakterien 48 h nach Infektion der Tiere aus verschiedenen Kompartimenten wie dem Blut, der Leber und der Haut reisoliert und hinsichtlich ihrer  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem Protein untersucht. Die Studie ergab eine hohe Aktivität bei KTL3 Hautisolaten, während die aus dem Blut als auch der Leber stammenden

Bakterien ihre Fähigkeit  $\alpha_2$ -M zu binden nahezu vollständig verloren hatten. Der Verlust dieser Funktion korreliert mit dem Verlust von GRAB auf der bakteriellen Oberfläche was durch einen direkten Nachweis von oberflächenlokalisiertem GRAB mittels anti-GRAB gerichteter Antikörper bestätigt werden konnte. Die Untersuchung zeigt, dass die Expression von Protein GRAB durch das umgebende Milieu in der Haut positiv beeinflusst wird, was auf eine biologische Funktion der Interaktion für den Erreger hinweist, während das Protein im Verlauf der systemischen Infektion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Bislang konnte die Regulation von Protein GRAB noch nicht eindeutig geklärt werden. Studien von Chausee *et al.*, 2002 und Graham *et al.*, 2002 weisen jedoch auf eine Beteiligung des Rgg Regulon sowie eine Negativregulation durch das Zwei-Komponenten System CovR-CovS (Cov, control of virulence) hin.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass eine Immunisierung mit rGRAB keinen Schutz gegen die Infektion mit *S. pyogenes* vermittelt und das Protein somit als Vakzin nicht geeignet ist. Die Tatsache, dass dem Virulenzfaktor eine biologische Funktion insbesondere während der Hautinfektion zukommt, macht es jedoch für einen therapeutischen Einsatz interessant, bei dem die Interaktion von GAS mit  $\alpha_2$ -M durch den Einsatz modifizierter  $\alpha_2$ -M bindender Peptide direkt während der Infektion der Haut inhibiert wird. Zu diesem Zweck und in der Absicht die Art der Interaktion von Protein GRAB und  $\alpha_2$ -M näher zu untersuchen wurde zunächst die  $\alpha_2$ -M Bindungsdomäne durch Generierung verkürzter rekombinanter GST-Fusionsproteine auf den N-terminalen Bereich  $\Delta A$  eingegrenzt, welcher daraufhin unter Verwendung kurzer, überlappender, synthetischer Peptide weiter untersucht wurde. Die Analyse ermöglichte die Identifizierung zweier unterschiedlicher Bindungsmotive (PR<sup>42</sup>IIPNGGTL) und (NAPEK<sup>60</sup>LALR<sup>64</sup>N), die jeweils eine starke Affinität für  $\alpha_2$ -M besitzen und in der N-terminalen  $\Delta A$ -Domäne von GRAB (Aminosäuren 34-67) lokalisiert sind. Das Ergebnis zeigte zum einen, dass die an die Bindungsdomäne angrenzenden Wiederholungssequenzen nicht an der Interaktion mit  $\alpha_2$ -M beteiligt sind, da sich die Inhibition der Bindung mit verkürzten rekombinanten Proteinen nahezu identisch zu der des Wildtyp Proteins verhält. Die Funktion dieser Region besteht daher möglicherweise darin den nötigen Abstand der Bindungsmotive zur Zellwand herzustellen, wobei die Anzahl der Wiederholungssequenzen, wie durch PCR Analyse an klinischen GAS Isolaten gezeigt werden konnte, keinen Einfluss auf die  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität hat. Die hohe Homologie von  $\Delta A$  zur  $\alpha_2$ -M bindenden Domäne von Protein G lässt des weiteren vermuten, dass es sich um einen identischen, bislang für diese beiden Proteine einzigartigen Bindungsmechanismus handelt. Um die für die Interaktion essentiellen Aminosäuren zu ermitteln wurden die

einzelnen Aminosäuren beider Motive an jeder Position gegen die 20 verbliebenen substituiert. Das Ergebnis zeigte, dass insbesondere die basischen Argininreste an Position 42 und 64 als auch der Lysinrest an Position 60 die Interaktion mit  $\alpha_2$ -M vermitteln. Dabei scheint Lys<sup>60</sup> hinsichtlich des gesamten Motivs, wie Abb. 11 deutlich wird, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Das synthetische Peptid mit der Sequenz GNAPEK<sup>60</sup>LAL (Abb. 11, Spot 5) war im Gegensatz zu dem Peptid NAPEK<sup>60</sup>LALR<sup>64</sup> nicht in der Lage  $\alpha_2$ -M zu binden. Erst die Verlängerung um Arg und Asn ermöglichte eine Interaktion. Aus diesem Grund wurde die spätere Mutagenese von Lys<sup>60</sup> vernachlässigt. Die Ergebnisse der Spotmembranen zeigen, dass die Bindung von  $\alpha_2$ -M an Protein GRAB in erster Linie durch basisch geladene Reste vermittelt wird, wobei die umgebenden Aminosäuren für die entsprechende Faltung des Proteins verantwortlich sind und somit ebenfalls die Bindungsaktivität beeinflussen. Die Annahme wird durch das Ergebnis gestützt, dass eine Substitution gegen Lysin (insbesondere im zweiten Motiv) die Affinität für  $\alpha_2$ -M verstärkt, während ein Austausch gegen saure Aminosäuren wie Asp oder Glu, unabhängig von der Position, zu einem vollständigen Verlust der Bindung in beiden Motiven führt.

Um die Ergebnisse der Spotmembran Analyse auf das gesamte Protein zu übertragen und den Einfluss der basischen geladenen Argininreste Arg<sup>42</sup> und Arg<sup>64</sup> zu untersuchen, wurden Glycin substituierte rekombinante Proteine rGRAB<sup>42</sup>, rGRAB<sup>64</sup> und rGARB<sup>42/64</sup> hergestellt und hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität für  $\alpha_2$ -M getestet. Es zeigte sich, dass der Austausch von Arg<sup>42</sup> einen kaum messbaren Einfluss auf die  $\alpha_2$ -M Bindungsaktivität hatte. Dagegen führte die Substitution von Arg<sup>64</sup> unter reduzierenden Bedingungen zu einem vollständigen Bindungsverlust. Obgleich es nicht möglich war eine Interaktion im Liganden Assay nachzuweisen, war es möglich die Bindung von  $\alpha_2$ -M an *S. pyogenes* mit rGRAB<sup>64</sup> unter physiologischen Bedingungen zu inhibieren. Der festgestellte Effekt konnte durch die Substitution von sowohl Arg<sup>42</sup> und Arg<sup>64</sup> verstärkt werden. Die Ergebnisse bestätigen somit, dass die Interaktion mit  $\alpha_2$ -M in erster Linie durch Arg<sup>64</sup> im hinteren Motiv vermittelt wird. Die Tatsache, dass ein Doppelaustausch von Arg<sup>42</sup> und Arg<sup>64</sup> zu einer weiteren Reduktion der Bindungsaktivität unter physiologischen Bedingungen führt, weist auf eine mögliche Beteiligung von Arg<sup>42</sup> bei der Ausbildung der Tertiärstruktur hin. Es ist denkbar, dass die Funktion von Arg<sup>42</sup> bei der Proteinfaltung darin besteht die zwei benachbarten Motive in die bestmögliche Position für eine Interaktion mit  $\alpha_2$ M bringen. Dabei wurde die Beteiligung von Arg<sup>42</sup> zunächst durch die hoch affine Bindungsstelle NAPEKLALR<sup>64</sup>N verdeckt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass sich rGRAB<sup>42</sup> nahezu identisch zu dem nicht substituierten Protein rGRAB verhält. Des Weiteren ist eine Beteiligung durch die flankierenden

Aminosäuren TLTNLL an der hohen Affinität von GRAB für  $\alpha_2$ -M nicht ausgeschlossen, wie durch die Spotmembran Analyse gezeigt werden konnte. Eine Inhibition der Bindung mit dem synthetischen Peptid IIPNGGTLTNLLGNA (Abb. 10, Spot 10) war nicht möglich und bestätigt erneut, dass eine Beteiligung der basischen Aminosäuren Arg<sup>42</sup> bzw. Arg<sup>64</sup> für eine Bindung essentiell ist. Es kann daher spekuliert werden, dass die Fähigkeit von GRAB zur Interaktion mit dem Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -M von dem Zusammenspiel zweier benachbarter Motive abhängt, von denen das Arg<sup>64</sup> enthaltende Motiv möglicherweise direkt an der Bindung beteiligt ist, während das zweite Motiv mit Arg<sup>42</sup> die korrekte Faltung der Bindungsdomäne unterstützt.

Die hier dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Interaktion des bakteriellen Oberflächenproteins GRAB mit dem menschlichen Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -M auf der Wechselwirkung mit basischen Aminosäureresten beruht und nicht aufgrund einer proteolytischen Spaltung der sog. ‚Bait-Region‘ erfolgt. Die Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass gebundenes  $\alpha_2$ -M weiterhin in der Lage ist Proteasen zu inhibieren (Rasmussen *et al.*, 1999). Da die Proteaseinhibition durch  $\alpha_2$ -M jedoch in einem 2:1 Verhältnis erfolgt kann eine eindeutige Klärung erst durch Analyse der Kristallstruktur von Protein GRAB bzw. dessen Bindungsdomäne, oder durch co-Kristallisation mit  $\alpha_2$ -M erfolgen. Die Herstellung modifizierter synthetischer Peptide bietet für diesen Zweck eine vielversprechende Möglichkeit und kann zusätzlich zur Identifizierung der GRAB bindenden Domäne von  $\alpha_2$ -M eingesetzt werden. Da es sich bei Protein GRAB um einen Virulenzfaktor von *S. pyogenes* handelt, ist es für ein besseres Verständnis dieser Interaktion von Interesse die Stabilität des Komplexes bzw. dessen Dissoziationsrate vor und nach dem Kontakt mit Proteasen zu untersuchen. Die Aufklärung des Bindungsmotivs für  $\alpha_2$ -M ermöglicht des weiteren die Herstellung synthetischer Peptide, welche im Vergleich zu der Originalsequenz eine gesteigerte Bindungsaktivität für  $\alpha_2$ -M aufweisen. Die densitometrische Analyse beider Bindungsmotive von GRAB zeigte, dass ein Austausch von z. B. Ile<sup>43</sup> gegen Met im ersten Motiv die Bindungsaktivität deutlich steigern kann. Ebenso verhält es sich mit Substitutionen von z. B. Ala<sup>57</sup> und Ala<sup>62</sup> durch das basisch geladene Lysin. Basierend auf diesen Ergebnissen bietet sich die Möglichkeit an mehreren Positionen modifizierte, den ganzen Bindungsbereich umfassende, synthetische Peptide herzustellen und hinsichtlich ihrer Affinität für  $\alpha_2$ -M zu testen. Die so hergestellten Konstrukte könnten für therapeutische Zwecke in Konkurrenz zu Protein GRAB bei *S. pyogenes* verursachten Hautinfektionen lokal eingesetzt werden, um die Interaktion von GAS mit dem Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -M zu unterbinden.

## V. Material und Methoden

### 1. Chemikalien, Säulenmaterial, Kits, Verbrauchsmaterial, Laborgeräte

Falls in der Tabelle nicht anders angegeben, wurden handelsübliche Chemikalien der Reinheitsklasse p.a. („pro Analysis“) verwendet.

**Tab. 2:** Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid-Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Aktivkohle	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampizillin	Sigma-Aldrich
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ABTS	Boehringer
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Blockierungsreagenz	Roche
Blutagar-Platten Columbia (5 % Schafblut)	Becton Dickinson
Bromphenolblau	Merck
Carrageenan	Sigma-Aldrich
CHAPS	AppliChem
Chloramin-T	Serva
Chloronaphtol	Sigma-Aldrich
Complete, Mini, EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche
Coomassie Brilliant Blue R-250	BioRad
CSPD	Boehringer
DYEnamic ET Terminator cycle sequencing mix	Amersham Pharmacia Biotech
Desoxyribonukleotide (dNTP's)	Amersham Pharmacia Biotech
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Entellan <sup>®</sup> neu Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Riedel-de Häen

---

Essigsäure 100% (Eisessig)	Baker
Ethanol	Baker
Ethanol (technisch)	Baker
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (37 %)	AppliChem
FCS (Fetal Calf Serum)	Greiner
Freund's Incomplete Adjuvant (i.c.F.A.)	Sigma-Aldrich
Gentamycin	Sigma-Aldrich
Genosys Blocking Buffer (10x)	Sigma-Aldrich
D- (+) -Glukose	Sigma-Aldrich
Glutathion	Merck
Glycerin (87 %)	Merck
Glycin	Merck
Harnstoff	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt, gepulvert	Difco
HEPES	Fluka
Heparin-Natrium (25.000 I.E.)	Ratiopharm
Imidazol	Sigma-Aldrich
<sup>125</sup> Iod-Natriumsalz	Amersham Pharmacia Biotech
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Baker
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalium-(di)-hydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
(Di)-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Serva
Maleinsäure	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Serva
Moviol 4-88	Calbiochem
Methanol	Baker
Mutanolysin	Sigma-Aldrich
N-Lauroylsarcosyl Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (CH <sub>3</sub> COONa)	Merck
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck

---

Natrium-(di)-hydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Baker
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Na-Metabisulfid	Merck
Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5000 $\mu\text{g/ml}$ )	Gibco
Penicillin G Sodium (1610 U/mg)	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	ICN Biomedicals
PMSF	Applichem
N-Propyl-Gallat	Sigma-Aldrich
Sigmacote	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Serva
Todd Hewitt Broth	Oxoid
Trichloracetat (TCA)	Fluka
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris-Base)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trockenmilchpulver (Glücksklee)	Nestle
Trypanblau	Merck
Tween-20	Merck
Wasserstoffperoxid 30 % ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth

**Tab. 3:** Eingesetztes Säulenmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CNBr-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech
Nickel-NTA Agarose	Qiagen
PD-10 Säulen	Amersham Pharmacia Biotech
Protein A-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech



**Tab. 4:** Verwendete Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System	Promega
QIAGEN <sup>®</sup> Genomic-tip System	Qiagen
DyeEx <sup>™</sup> Dye-Terminator Removal System	Qiagen
QIAprep Spin Plasmid Kit (Mini, Midi)	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
Slidex Strepto A-Kit	Bio-Merieux

**Tab. 5:** Verwendetes Material

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Cellophan Folie	BioRad
Dialysemembran (Snake Skin Dialysis Tube)	Pierce
Dialysefilter (VS-Filter, Porendurchmesser 0,025 µm)	Millipore
Elektroporationsküvetten	BioRad
Einmal Sterilfilter	Sartorius
Einwegkanülen und –spritzen	Braun
Einwegküvetten	Brand
3 ml Glasröhrchen	Sigma
Mikrotiterplatten (Maxisorb)	Nunc
Nitrozellulosemembran	BioRad
Nylonmembran	Millipore
Objekträger (Superfrost PLUS <sup>®</sup> )	Zeiss
Quarzglasküvette	Helma
Vivaspin (smallskip)	Vivascience
Whatman-Filterpapier	BioRad

**Tab. 6:** Verwendete Laborgeräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Affinitätschromatographie Anlage Econo-System	BioRad
Agarosegelelektrophoresekammer (Horizon <sup>®</sup> 58)	Gibco

Akku-Schermaschine Modell 8000 AD	Albrecht GmbH & Co
Brutschrank	Heraeus
Elektroporationsgerät (Gene Pulser™)	BioRad
ELISA Reader (3550-UV Microplate Reader)	BioRad
French Pressure Cell Press	SLM Instruments
Geltrockner Gel Air Drying System	BioRad
Homogenisator (Polytron PT1200)	Kinematica
Inkubationsroller RM 5	Assistent
Mikrotom (rotary microtom RM 2135)	Leica
Mikroskop, Axioskop für Immunfluoreszenz	Zeiss
Negativmaterial Fujicrome Sensia 400, Sensia 100	Fuji
PCR-Thermocycler	Biozyme
PCR-Thermocycler	Hybaid
4054 UV/Visible Spectrophotometer Ultraspec Plus	Pharmacia
Photometer Novaspec II	Amersham Pharmacia Biotech
Scherkopf S40 (1/10 mm)	Albrecht GmbH & Co
SDS-Gelelektrophoresekammer Mini Protean II	BioRad
SpeedVac	Savant
Thermomixer (5436)	Eppendorf
Thermoblock (TECHNE DRI-Block® DB2D)	Labtech International
Transblot-SD Semidry Transfer Cell	BioRad
Vakuum-Blot-Apparatur	Apligene-Oncor
Video-Dokumentation (Midi Doc™ Documentation System)	Herolab
Videoprinter (mitsubishi video copy processor)	Herolab

## 2. Proteine, Enzyme, Antikörper

**Tab. 7:** Verwendete Proteine

Bezeichnung	Expressionsvektor	Hersteller
$\alpha_2$ -Makroglobulin (human plasma)		Sigma-Aldrich
BSA (Bovine Serum Albumin)		Sigma-Aldrich
Plasminogen (human plasma)		Sigma-Aldrich
Plamin (human plasma)		Sigma-Aldrich

rGRAB	pQGR	diese Arbeit
rGRAB <sup>42</sup>	pQGR-42	diese Arbeit
rGRAB <sup>64</sup>	pQGR-64	diese Arbeit
rGRAB <sup>42/64</sup>	pQGR-42/64	diese Arbeit
rPG-A	pQA	diese Arbeit
rPG-AR1	pQAR1	diese Arbeit
rPG-AR2	pQAR2	diese Arbeit
rGST-ΔA	pGΔA	diese Arbeit
rGST-A	pGA	diese Arbeit
rGST-AR1	pGAR1	diese Arbeit
rGST-AR2	pGAR2	diese Arbeit

**Tab. 8:** Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
CIP (“calf-intestine-alkaline-phosphatase”)	Sigma-Aldrich
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs
Lysozym	Sigma-Aldrich
Mutanolysin	Sigma-Aldrich
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Sigma-Aldrich
RNase A	Sigma-Aldrich
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen

**Tab. 9:** Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Maus anti-Human IgG Peroxidase-konjugiert	PharMingen
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase-konjugiert	Dianova
Ziege anti-Maus IgG Biotin-konjugiert	Sigma-Aldrich
Ziege anti-Kaninchen IgG FITC-konjugiert	Sigma-Aldrich
Ziege anti-Kaninchen IgG TRITC-konjugiert	Sigma-Aldrich

---

Ratte anti-Maus RB6 PE-konjugiert	PharMingen
Ratte anti-Maus F480 FITC-konjugiert	PharMingen
Kaninchen anti-human- $\alpha_2$ -Makroglobulin IgG Fraktion	Sigma-Aldrich
Kaninchen anti-GAS Serum gegen Hitze inaktivierten A20 (DSMZ 2071)	Arbeitsgruppe MPAT (Molinari <i>et al.</i> , 1997)
Kaninchen anti-rGRAB Protein Serum	diese Arbeit
Kaninchen anti-rGRAB Protein IgG Fraktion	diese Arbeit
Kaninchen anti-rGST-A IgG Fraktion	diese Arbeit

---

### 3. Puffer und Lösungen, Medien, Supplemente

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser, welches zusätzlich über eine Milli-Q Anlage filtriert wurde (MQ-H<sub>2</sub>O), angesetzt.

#### Puffer für die Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose:

<u>Lysispuffer (1):</u>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
		pH 8,0
<u>Waschpuffer (2):</u>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	2 mM	PMSF (in Isopropanol gelöst)
		pH 8,0
<u>Elutionspuffer (3):</u>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
		pH 8,0

Anstelle von PMSF (AppliChem) wurde ersatzweise EDTA freier Protease Inhibitor Cocktail der Firma Roche in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration verwendet.

**Puffer für die Affinitätschromatographie mit Glutathion Sepharose 4B:**

<u>Glutathionpuffer:</u>	10 mM	Glutathion
	50 mM	Tris-HCl
		pH 8,0
<u>Regenerationspuffer (1):</u>	100 mM	Tris-HCl
	500 mM	NaCl
		pH 8,5
<u>Regenerationspuffer (2):</u>	100 mM	CH <sub>3</sub> COONa
	500 mM	NaCl
		pH 4,5 (mit Acetat einstellen)

**Puffer für die Ligandenkopplung an CNBr-Sepharose:**

<u>Kopplungspuffer:</u>	100 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	500 mM	NaCl
		pH 8,3 (mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> einstellen)
<u>Acetatpuffer:</u>	100 mM	CH <sub>3</sub> COONa
		pH 4,0 (mit Eisessig einstellen)

**Puffer und Stammlösungen:**

<u>PBS (10x):</u>	80 g/l	NaCl
	2 g/l	KCl
	14,3 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
	2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,2
<u>PBST:</u>		PBS + 0,05% Tween-20

<u>PB-Puffer:</u>	50 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	50 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
		pH 7,5
<u>TAE (50x):</u>	242 g/l	Tris
	57,1 ml/l	Eisessig
	100 ml/l	500 mM EDTA (pH 8,0)
		pH 8,0
<u>TBS:</u>	8 g/l	NaCl
	0,2 g/l	KCl
	6,1 g/l	Tris (50 mM)
		pH 7,0 (bei 4°C lagern)
<u>TBST:</u>		TBS + 0,05% Tween-20 (bei 4°C lagern)
<u>TE:</u>	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
		pH 8,0

**Puffer und Lösungen für DNA:**

<u>KGB-Puffer (10x):</u>	1 M	K-Glutamat
	250 mM	Tris-Acetat
	100 mM	Magnesium-Acetat
	5 %	BSA (10 mg/ml)
	5 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
		pH 7,6 (Puffer wird sterilfiltriert)
<u>DNA-Ladepuffer (6x):</u>	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	30 %	Glycerol
		Alle Komponenten wurden in TAE gelöst.

<u>STET-Puffer:</u>	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	5 %	Triton X-100
		pH 8,0

**Puffer und Lösungen für SDS-Page und Western-Blot:**

<u>Proteinprobenpuffer:</u>	500 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	10 %	Glycerol
	2,5 %	SDS
	0,025 %	Bromphenolblau
	5 %	β-Mercaptoethanol
		pH 6,8

<u>Laufpuffer (8x):</u>	125 mM	Tris-HCl
	1 M	Glycin
	0,5 %	SDS

<u>Sammelgelpuffer:</u>	0,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
-------------------------	--------	------------------

<u>Trenngelpuffer:</u>	1,5 mM	Tris-HCl, pH 8,8
------------------------	--------	------------------

<u>SDS-Stocklösung:</u>	10 %	SDS
-------------------------	------	-----

<u>APS-Stocklösung:</u>	10 %	APS
-------------------------	------	-----

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	1 g/l	Coomassie Brilliant Blue R-250
	100 ml	Eisessig
	500 ml	Methanol
	400 ml	H <sub>2</sub> O

<u>Entfärberlösung:</u>	100 ml	Eisessig
	400 ml	Methanol
	500 ml	H <sub>2</sub> O

<u>Blottingpuffer:</u>	5,8 g/l	Tris
(Bjerrum, Schafer-Nielsen)	2,9 g/l	Glycin
	0,037 %	SDS
	20 %	Methanol

**Puffer und Lösungen für die Spot Membran Entwicklung:**

<u>Blockierungspuffer:</u>	2 ml	Genosys-Blocking Puffer
(Ansatz für 10 ml)	8 ml	TBST (pH 8,0)
	0,5 g	Saccharose

Neue Blockinguffer werden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und als 10 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

<u>Puffer A:</u>	8 M	Harnstoff
	1 %	SDS
	0,5 %	β-Mercaptoethanol
		pH 7,0

(Ansatz wird ohne β-Mercaptoethanol gelagert. Der pH Wert muß nach Zugabe mit Essigsäure eingestellt werden)

<u>Puffer B:</u>	10 %	Essigsäure
	50 %	Ethanol
	40 %	H <sub>2</sub> O

**Puffer für ELISA:**

<u>Coating-Puffer:</u>	2,93 g/l	NaHCO <sub>3</sub>
	1,59 g/l	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
		pH 8-9

Der Puffer sollte nicht länger als 2 Wochen gelagert werden.

<u>Blocking-Puffer (PBSA):</u>	1 %	BSA, gelöst in PBS
--------------------------------	-----	--------------------

<u>Waschpuffer:</u>		PBST
---------------------	--	------



<u>Substratpuffer:</u>	150 mg	ABTS
	500 ml	100 mM Citrat in H <sub>2</sub> O
		pH 4,35

**Puffer und Lösungen für Southern Blot:**

<u>Depurinierungspuffer:</u>	250 mM	HCl
------------------------------	--------	-----

<u>Denaturierungspuffer:</u>	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl

<u>Neutralisierungspuffer:</u>	1 M	Tris
	1,5 M	NaCl
		pH 7,5

<u>SSC (20x):</u>	3 M	NaCl
<u>(Transferpuffer)</u>	0,3 M	Na-Citrat
		pH 7,0

<u>Waschpuffer (1):</u>	0,1 %	SDS, gelöst in SSC (2x)
-------------------------	-------	-------------------------

<u>Waschpuffer (2):</u>	0,1 %	SDS, gelöst in SSC (0,5x)
-------------------------	-------	---------------------------

<u>Waschpuffer (3):</u>	0,3 %	Tween-20, gelöst in Maleinsäurepuffer
-------------------------	-------	---------------------------------------

<u>Maleinsäurepuffer:</u>	100 mM	Maleinsäure
	150 mM	NaCl
		pH 7,5

<u>Blockierungsstammlösung:</u>	10 %	Blockierungsreagenz, in Maleinsäurepuffer (Lösung autoklavieren und bei 4 °C lagern)
---------------------------------	------	---

Prähybridisierungslösung:

1 %	Blockierungsreagenz
0,1 %	N-Lauroylsarcosyl Natriumsalz
0,02 %	SDS

Alle Komponenten werden in SSC(5x) gelöst.

N-Lauroylsarcosyllösung: 10 % N-Lauroylsarcosyl-Natriumsalz (gelöst in 250 mM EDTA), pH 8,0

Hybridisierungslösung:

100 pmol Digoxigenin-dUTP markierte Fragmentsonde in Prähybridisierungslösung

Substratpuffer:

100 mM	Tris
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl <sub>2</sub>

pH 9,5

Substratlösung: CSPD (1:3000) in Substratpuffer verdünnt

Antikörperkonjugatpuffer: 1 % Blockierungsreagenz, in Maleinsäurepuffer (Frisch aus der Stocklösung ansetzen)

Antikörperkonjugatlösung:

Die Detektion erfolgte mit anti-Digoxigenin (Dig) IgG, der mit AP (Alkalischer Phosphatase) konjugiert ist und in Antikörperkonjugatpuffer 1:5000 verdünnt wurde.

**Lösungen für die Immunfluoreszenz:**

Einbettungsmittel:

20 g Moviol wurden über Nacht durch Rühren in 80 ml PBS gelöst und anschließend mit 40 ml reinem, für die Fluoreszenzmikroskopie geeignetem Glycerin versetzt. Die Lösung wurde erneut über Nacht gerührt und 1 Stunde bei 15.000 rpm abzentrifugiert. Nach Zugabe von 0,2 % Natriumazid wurden 900 µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

Bleichschutz:

2,5 g N-Propyl-Gallat wurden in 50 ml PBS gelöst, mit 50 ml Glycerin versetzt und über Nacht gerührt. Die Lagerung erfolgte dunkel bei 4 °C.

**Färbelösung für die Histologie:**

<u>Azur-Eosin Lösung (40 ml):</u>	4,0 ml	Azure A (0,1 %)
	4,0 ml	Eosin B (0,1 %)
	1,75 ml	5 M Essigsäure (1,15 ml ad 100 ml H <sub>2</sub> O)
	0,3 ml	5 M Natrium-Acetat (2,72 g ad 100 ml H <sub>2</sub> O)
	5,0 ml	Aceton
	25,0 ml	H <sub>2</sub> O

Azur A und Eosin B wurden als 1 % Stocklösungen vorbereitet und entsprechend auf 0,1 % verdünnt. Um ausgefallene Farbrückstände zu entfernen muß die Lösung vor jedem Gebrauch durch einen Faltenfilter filtriert werden.

**Nährmedien:**

Alle Komponenten wurden in deionisiertem Wasser gelöst. Falls nicht anders angegeben wurden die Medien für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden nach Abkühlung des Mediums auf 50 °C steril zugegeben. Zur Herstellung von Festmedien wurden 1,8 % (w/v) Bacto-Agar beigelegt.

<u>Luria-Bertani (LB):</u>	10 g/l	Bacto-trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
		pH 7,5
<u>THY:</u>	36,4 g/l	Todd Hewit Broth (THB)
	0,5 %	Hefeextrakt
		pH 7,4
<u>Einfriermedium:</u>	1 %	Casaminosäure
	10 %	Glycerin

<u>Einfriermedium</u>	570 µl	Glycerin wurde in Kryoröhrchen vorgelegt
<u>(für Flüssigkulturen):</u>	430 µl	und Bakterienkultur dazugegeben

### Zellkulturmedien:

**Tab. 10:** Verwendete Zellkulturmedien

Medium	Zusätze
DMEM-Hepes	10 % FCS
DMEM-Hepes	10 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5000 µg/ml)

### Supplemente

<u>Lysozym:</u>	10 mg/ml	in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (frisch angesetzt,
	100 mg/ml	in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (frisch angesetzt)
<u>RNase:</u>	5 mg/ml	in TES Puffer, pH 8,0 (Hitzeinaktivierung von DNasen für 15 min, 95 °C; Lagerung der Aliquots bei –20 °C)
<u>Proteinase K:</u>	5 mg/ml	in TES Puffer, pH 8,0 (Aliquots bei –20 °C)
	20 mg/ml	in TES Puffer, pH 8,0 (Aliquots bei –20 °C)
<u>Mutanolysin:</u>	50.000 U/ml	in 10 mM Tris-HCl pH 7,4
<u>X-Gal:</u>	2 %	in DMF

### Antibiotika:

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und aliquotiert. Gentamycin wurde bei 4 °C, alle übrigen Antibiotika-Stock-Lösungen bei -20 °C gelagert.

**Tab. 11:** Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung
Ampicillin (Amp)	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml

Gentamycin (Gm)	H <sub>2</sub> O	10 mg/ml
Kanamycin (Km)	H <sub>2</sub> O	50 mg/ml
Penicillin G (P)	H <sub>2</sub> O	1 mg/ml

#### 4. Plasmide, Oligonukleotide

**Tab. 12:** Plasmide und Derivate

Plasmide	Genotyp	Referenz
pCR <sup>TM</sup> 2.1-TOPO	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>high-copy</i> Plasmid zur Subklonierung von PCR Produkten; <i>lac</i> -Operon; 3931 bp	Invitrogen
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Amp <sup>r</sup> , <i>high-copy</i> Plasmid zur Subklonierung von PCR Produkten; <i>lac</i> -Operon; 3015 bp	Promega
pQE-30	Amp <sup>r</sup> , Protein Expressions-Vektor mit 6 Histidinen N-terminal der Multiple-Cloning-Site (MCS); 3461 bp	Qiagen
pGEX-6P-1	Amp <sup>r</sup> , Protein Expressions-Vektor mit GST ( <i>Schistosoma japonicum</i> ) N-terminal der MCS; 4900 bp	Amersham Pharmacia Biotech
pQGR	pQE-30 Derivat mit einem 447 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 182; GI: 4589078); Primer: 3/4	diese Arbeit
pQGR-42	pQE-30 Derivat von pQGR mit R42/G Substitution	diese Arbeit
pQGR-64	pQE-30 Derivat von pQGR mit R64/G Substitution	diese Arbeit
pQGR-42/64	pQE-30 Derivat von pQGR mit R42/G und R64/G Substitution	diese Arbeit
pQA	pQE-30 Derivat mit einem 174 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 91; GI: 4589078); Primer 3/6	diese Arbeit
pQAR1	pQE-30 Derivat mit einem 258 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 119; GI: 4589078); Primer 3/7	diese Arbeit
pQAR2	pQE-30 Derivat mit einem 342 bp <i>grab</i> -Fragment	diese Arbeit

	(Aminosäuren 34 – 147; GI: 4589078); Primer 3/8	
pGΔA	pGEX-6p-1 Derivat mit einem 102 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 67; GI: 4589078); Primer 3/5	diese Arbeit
pGA	pGEX-6p-1 Derivat mit einem 174 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 91; GI: 4589078), Primer 3/6	diese Arbeit
pGAR1	pGEX-6p-1 Derivat mit einem 258 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 119; GI: 4589078); Primer 3/7	diese Arbeit
pGAR2	pGEX-6p-1 Derivat mit einem 342 bp <i>grab</i> -Fragment (Aminosäuren 34 – 147; GI: 4589078); Primer 3/8	diese Arbeit

Tab. 13: Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	bp Pos. im <i>grab</i> -Gen Accession No: GI:4589078
1	grab-F	5'- <u>ATG</u> GGAAAAGAAATAAAAGTGAAATGC-3'	1-27
2	grab-R	5'- <u>CTA</u> ATTTTCTTTGCACTTTGAACTTAC-3'	654-628
3	grab-BamHI	5'-CGC <b>GGATCC</b> GTTGACTCACCTATCGAACAGCC-3'	100-122
4	grab-KpnI	5'-CGG <b>GGTACC</b> <u>CTA</u> GGTATTAACGTTTTGTCTTTCTTCTTT-3'	546-520
5	ΔA-EcoRI	5'-CG <b>GAATTC</b> TTCTTCATTACGTAATGCCAGTTTTTC-3'	201-175
6	A-EcoRI	5'-CG <b>GAATTC</b> ACTTGCTGCTTCTATAGCTGTCG-3'	273-251
7	R1-EcoRI	5'-CG <b>GAATTC</b> AGCAGCGTTATCCGCTTTAACAAC-3'	357-334
8	R2-EcoRI	5'-CG <b>GAATTC</b> AGCAGCGTTATCTGATTGAACTAC-3'	441-418
9	MI-F	5'-CCTATCGAACAGCCT <sup>G</sup> <sub>C</sub> GAATTATTCCAAATGGCGGAAC-3'	109-146
10	MI-R	5'-CCATTTGGAATAATTC <sup>G</sup> <sub>C</sub> AGGCTGTTTCGATAGGTGAG-3'	140-105
11	MII-F	5'-CAGAAAACTGGCATT <sup>G</sup> <sub>C</sub> GTAATGAAGAAAGAGCCATTGATG-3'	173-214
12	MII-R	5'-GCTCTTTCTTCATTAC <sup>G</sup> <sub>C</sub> TAATGCCAGTTTTTCTGGAG-3'	206-170

Die rot dargestellten Nukleotidsequenzen bezeichnen eingefügte Restriktionsschnittstellen. Unterstrichene Sequenzen markieren Start- und Stop-Codons. Die Primer MI und MII wurden zusätzlich mit Punktmutationen versehen, welche rot unterstrichen dargestellt sind. Als Referenz wurde der *S. pyogenes* Stamm SF370 verwendet (Accession No. GI: 4589078).

## 5. Bakterien

### 5.1 Bakterienstämme

In der folgenden Tabelle werden die für diese Arbeit verwendeten *E. coli* sowie Gruppe A Streptokokken Stämme aufgeführt. Eine Gesamtübersicht der klinischen *S. pyogenes* Isolate befindet sich im Anhang.

**Tab. 14:** Verwendete *E. coli* Sämme

Stamm	Genotyp/Serotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Nal <sup>S</sup> Str <sup>S</sup> Rif <sup>S</sup> Thi <sup>-</sup> lac <sup>-</sup> ara <sup>+</sup> gal <sup>+</sup> mtl <sup>-</sup> F' recA <sup>+</sup> uvr <sup>+</sup> lon <sup>+</sup>	Qiagen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] <sup>c</sup>	Stratagene
<i>E. coli</i> TOPO 10F'	F' {lacI <sup>q</sup> Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD 139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen

**Tab. 15:** Verwendete *S. pyogenes* Sämme

Stamm	Genotyp/Serotyp	Herkunft
<i>S. pyogenes</i> KTL3	M1 Serotyp, isoliert aus Blut („Finnish Institute of Health“)	Rasmussen <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pyogenes</i> MR4	grab-Mutante generiert aus KTL3 durch Insertionsmutagenese (sekretiert ein verkürztes GRAB Fragment durch Deletion der Membrananker kodierenden Region), Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Rasmussen <i>et al.</i> , 1999

### 5.2 Kultivierung und Lagerung

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in den unter V 3. beschriebenen Nährmedien. *E. coli* Stämme wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium kultiviert. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte schüttelnd bei 37 °C und 110 rpm. Kulturen zur Proteinüberexpression wurden nach Erreichen der gewünschten Zelldichte mit IPTG induziert und weitere 5h bei 30 °C geschwenkt (V 8.1). *S. pyogenes* wurde bei 37 °C in THY stehend

kultiviert. Kulturen aus primären Bindungsversuchen wurden bei 110 rpm geschwenkt. Das Kulturvolumen betrug 50 ml. Größere Ansätze wurden in 1 l Erlenmeyerkolben ohne Schikane inkubiert.

Kurzfristige Lagerung (maximal 3 Wochen) erfolgte auf LB-Agarplatten (*E. coli*) bzw. auf Blutagarplatten (*S. pyogenes*). Zur Herstellung von *E. coli* Stammkulturen wurden Kolonien von frisch überimpften Platten in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. *S. pyogenes* wurde sowohl direkt aus der Flüssigkultur nach Erreichen der späten logarithmische Wachstumsphase, als auch von Blutagarplatten entnommen und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.3 Erstellung von Wachstumskurven

Das Wachstumsverhalten verschiedener *S. pyogenes* Stämme wurde mittels spektrophotometrischer Messungen verglichen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 3 ml THY (in Transmissionsröhrchen) mit Bakterien einer stationären Übernachtskulturen angeimpft. Die optische Dichte wurde dabei auf einen Ausgangswert von  $\text{OD}_{600} = 0,04$  eingestellt. Die Kulturen wurden anschließend bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  stehend inkubiert und alle 30 min. photometrisch vermessen. Als Abgleich diente steriles THY. Alle Werte wurden parallel in Doppelansätzen ermittelt.

## 6. Versuchstiere

Die eingesetzten Tiere stammen aus pathogenfreien standardisierten Inzuchtlinien und hatten ein Alter von 9-15 Wochen. Alle Versuche wurden nach geltenden Niedersächsischen Tierschutzrichtlinien genehmigt und durchgeführt.

**Tab. 16:** Verwendete Tiere

Mauslinie	Genotyp	Herkunft/Referenz
BALB/c	BALB/cAnNHsd, Weibchen	Harlan Winkelmann GmbH
C3H	C3H/HeNHsd, Weibchen	Harlan Winkelmann GmbH



## 7. Arbeiten mit DNA

### 7.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA

**7.1.1 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*.** Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen erfolgte durch das sogenannte „Lysis by Boiling“ Verfahren in Anlehnung an die Methode von Holmes *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Zu diesem Zweck wurden Bakterien aus jeweils 2 ml Übernachtskultur mittels Zentrifugation (10 min, 18.000 g, RT) pelletiert und anschließend in 350 µl STET-Puffer (V 3.) resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl frisch gelöstem Lysozym (10 mg/ml) wurden die Proben für 60 sek bei 100 °C inkubiert und zur Trennung von DNA und Zelltrümmern für weitere 15 min, bei 18.000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde, vorsichtig in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und durch Zugabe von 40 µl Natrium-Acetat (2,5 M, pH 5,2) und 420 µl Isopropanol für 5 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min, bei 18.000 g und RT konnte der Überstand verworfen und die pelletierte DNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen werden. Die Trocknung der eluierten DNA erfolgte entweder an der Luft bei RT oder mittels einer SpeedVac. Zur Weiteren Verwendung wurde die DNA in 50 µl TrisHCl (10 mM, pH 8,5) mit RNase (5 µg/ml) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierung, Transformation oder PCR wurde gemäß den Herstellerangaben von Qiagen mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit im Mini- als auch im Midi-Präp Maßstab gewonnen und in TrisHCl (10 mM, pH 8,5) bei -20 °C gelagert.

**7.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus *E. coli* und *S. pyogenes*.** Die Präparation chromosomaler DNA von *E. coli* erfolgte mittels QIAGEN® Genomic-tip System gemäß den Herstellerangaben. Für die Extraktion chromosomaler DNA aus *S. pyogenes* wurde ebenfalls das Qiagen System verwendet. Für einen verbesserten Zellaufschluß der grampositiven Streptokokken wurde jedoch anstelle der empfohlenen Konzentrationen jeweils 100 µl Lysozym (100 mg/ml), 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 100 µl Mutanolysin (50.000 U/ml) für 45 min bei 37 °C eingesetzt. Um ein Überladen der Midi (tip 100/G) Säulen zu vermeiden wurde das Aufschlussvolumen auf 5 ml Übernachtskultur beschränkt.

**7.1.3 Gelaufreinigung von DNA aus Agarose.** Die Gelaufreinigung von DNA Fragmenten wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit durchgeführt. Dazu wurde die aufzureinigende DNA zuerst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt mit

Ethidiumbromid gefärbt und nach der Dokumentation ausgeschnitten, gewogen und entsprechend der Herstellerangaben von Qiagen aufgereinigt. Die Säulenelution der DNA erfolgte in Abhängigkeit von der Bandenstärke in 30-60 µl TrisHCl (10 mM, pH 8,5).

**7.1.4 Säulenaufreinigung von DNA.** Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten und Plasmiden wurden das QIAquick PCR-Purification als auch das QIAquick Nucleotide Removal Kit entsprechend der Angaben von Qiagen eingesetzt. Dieser zusätzlich Reinigungsschritt diente der Entfernung von Salzen, Polysacchariden sowie Proteinen aus vorhergehenden Reaktionen oder zur Verbesserung der Qualität bereits aufgereinigter Plasmid-DNA. Die Säulenelution erfolgte mit 30-60 µl TrisHCl (10 mM, pH 8,5)

**7.1.5 Ethanolpräzipitation von DNA.** Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ethanolpräzipitation zur Aufkonzentration sowie zur Reinigung extrahierter DNA verwendet. Das Prinzip der Präzipitation beruht dabei auf der Herabsetzung der Lösungsmittelpolarität durch die Zugabe von Ethanol. Der DNA wird dabei ihre Hydrathülle entzogen wodurch es zur Ausbildung von Salzen mit Natrium oder anderen Komponenten kommt, die dann als unlösliche Phase vorliegen.

Zu diesem Zweck wurde die entsprechende DNA-haltige Lösung mit  $\frac{1}{10}$  Vol Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2 Vol 100 % EtOH p.A. gemischt und für 10 min bei RT gefällt. Das Präzipitat wurde durch 15 min Zentrifugation bei 18.000 g pelettiert und mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen, wodurch verbliebene Salzrückstände entfernt wurden. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes konnte das Pellet bei RT oder in einer SpeedVac getrocknet werden. Das Resuspendieren erfolgte in entsprechenden Volumina H<sub>2</sub>O, TrisHCl (10mM, pH 8,5) oder TE-Puffer (V 3.).

## 7.2 Analyse von DNA-Präparationen

**7.2.1 Agarosegelelektrophorese.** Da DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung in einem angelegten elektrischen Feld wandern, kann diese Eigenschaft bei der Agarosegelelektrophorese genutzt werden, um Fragmente ihrer Größe und Konformation nach aufzutrennen. Die verwendeten Proben werden dabei mit DNA-Ladepuffer (V 3.) im Verhältnis 1:6 versetzt und auf 0,8-2,0 %ige Agarosegele in TAE-Puffer geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für ca. 60 min in einer Minigelkammer des Typs Horizon<sup>®</sup> 58. Nach Beendigung eines Laufs wurde das Agarosegel für 10-20 min in einem

Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt und unter Verwendung eines UV-Transluminators, aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von Ethidiumbromid, visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit dem EASY-System von Herolab.

Die Größenbestimmung linearer DNA-Fragmente erfolgte durch einen Vergleich mit einem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandart. Durch einen Vergleich der Laufweiten konnte die Fragmentgröße abgeschätzt oder mittels halblogarithmischer Auftragung des Markers gegen die Laufstrecke des zu bestimmenden DNA-Fragments genauer bestimmt werden (Aaij *et al.*, 1972). Die verwendeten Größenstandards sind im Anhang aufgeführt.

**7.2.2 Quantifizierung von DNA.** Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Vergleichende Messung der OD<sub>260</sub> nm bzw. OD<sub>280</sub> nm bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> nm = 1 entspricht dabei 50 µg/ml dsDNA bzw. 33 µg/ml ssDNA. Bei reiner DNA sollte das Verhältnis von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ≥ 1.8 sein. Niedrigere Quotienten deuten auf Verunreinigungen von Proteinen oder aromatische Substanzen wie z.B. Phenol hin. Werte > 2 können durch RNA Kontamination verursacht werden.

In einer weiteren Methode wurde die DNA mit Hilfe eines λ-*Hind*III-Markers direkt aus dem Gel abgeschätzt. Dazu wurde eine genau definierte Menge von λ-DNA (MBI Fermentas) mit *Hind*III entsprechen der Herstellerangaben geschnitten und in entsprechenden Volumina auf das Gel aufgetragen. Die Konzentration der DNA konnte durch einen Vergleich der Bandenintensität abgeschätzt werden.

<u>λ-<i>Hind</i>III-Marker:</u>	100 µg	λ-DNA
	x µl	Enzym-Puffer (10x)
	100 U	<i>Hind</i> III
	x µl	H <sub>2</sub> O
		ad 500 µl

(Der Ansatz wurde bei 37°C über Nacht verdaut, anschließend Hitzeinaktiviert und unter Zugabe von 167 µl DNA-Ladepuffer (6x) und 333 µl H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl eingestellt, was einer DNA Konzentration von 0,1 µg/µl entspricht.)

### 7.3 Modifizierung von DNA

**7.3.1 Restriktionsanalyse.** Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller unter Verwendung von NEB- bzw. KGB-Puffern (V 3.) Die Verdaue wurden standardmäßig im folgenden Verhältnis angesetzt:

1 µg DNA : 1 U Restriktionsenzym im 10-fachen Endvolumen

Der Glycerinanteil sollte dabei unter 10 % liegen. Es wurde jeweils bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur über einen Zeitraum von 1-24 h inkubiert. Die Kontrolle sowie Aufreinigung geschnittener DNA-Fragmente erfolgte mittels der AGE.

**7.3.2 Dephosphorylierung.** Die Dephosphorylierung wurde eingesetzt, um eine Religation von Vektor-DNA nach dem Verdau mit nur einem Restriktionsenzym zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden die 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase abgespalten. Dazu wurde die DNA im doppelten Volumen unter Zugabe von x µl CIP-Puffer (10x) („calf-intestine-phosphatase“ Puffer) und 1 µl (1 U/µl) CIP („calf-intestine-phosphatase“) aufgenommen. Die Erhöhung des Volumens diente dabei der Verringerung der Salzkonzentration, durch die die Aktivität der Phosphatase gehemmt wird. Der Ansatz wurde zuerst 10 min bei 37 °C und danach für 10 min bei 55 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde nach erneuter CIP Zugabe wiederholt. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Vol EDTA (0,5 M, pH 8,0) und 10 min Inkubation bei 75 °C. Im Anschluß wurde die dephosphorylierte Plasmid-DNA mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit aufgereinigt und quantifiziert.

**7.3.3 Entsalzung mittels Dialyse.** Zur Entfernung von Salzurückständen wurde die entsprechende DNA-Lösung auf einen Dialysefilter mit 0,025 µm Porendurchmesser aufgetropft, welcher sich auf einem mit deionisiertem Wasser gefüllten Well einer 24-Well Platte befand. Nach 20 min wurde die Lösung vorsichtig in ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

**7.3.4 Auffüllen von 5'-Überhängen.** Das Auffüllen von Restriktionsschnittstellen zur Generierung von „Blunt-Ends“ erfolgte durch die Zugabe von „DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment“ mit 3'→5' Exonuklease Aktivität und deletierter 5'→3' Exonuklease Funktion, wodurch 5'-Überhänge aufgefüllt und 3'- Überhänge entfernt wurden. Dazu wurde

die zuvor geschnittene DNA aufgereinigt (V 7.1.4) und die Schnittstellen unter Zugabe von NEB-Puffer (10x), 33 µM dNTPs und 1 U Klenow/µg DNA für 15 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch EDTA (10 mM Endkonzentration) und anschließende Hitzeaktivierung für 20 min bei 75 °C gestoppt. Reste von Enzym und Puffer wurden mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit entfernt (V 7.1.4).

**7.3.5 Ligation von DNA Fragmenten.** Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Zugabe von T4-Ligase (5-10 U) und T4-Ligase-Puffer (10x) in wässriger Lösung entsprechend der Herstellerangaben. Das Verhältnis von Vektor und zu klonierendem DNA-Fragment wurde in Abhängig von der Fragmentgröße auf 1:2 bzw. 1:4 in 10-20 µl Gesamtvolumen eingestellt und bei 8-14 °C über Nacht inkubiert.

#### 7.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (Erlich *et al.*, 1988) zur gezielten Vervielfältigung von DNA Fragmenten wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Klonierung, zur Detektion von Klonen mittels Kolonie PCR, als auch für die Sequenzierung verwendet. Der Versuchsablauf wurde dabei an den jeweiligen Verwendungszweck angepaßt.

Als Template für die PCR diente sowohl Plasmid DNA als auch chromosomale DNA, welche zuvor säuleneluiert und photometrisch quantifiziert wurde. Die eingesetzten Konzentrationen lagen zwischen 50-150 ng in Abhängigkeit vom jeweiligen Ansatz. Für die Amplifikation der DNA Fragmente wurde standardmäßig die *Taq* DNA-Polymerase und für Ansätze mit höherer Genauigkeit die *Pfu*<sup>TM</sup> DNA-Polymerase aufgrund ihrer „proof-reading“ Eigenschaft eingesetzt. Die Oligonukleotidprimer wurden von Gibco synthetisiert auf eine Konzentration von 1 nmol mit H<sub>2</sub>O eingestellt und für die entsprechenden PCR Reaktion auf 20 pmol verdünnt. Alle Primer wurden für eine Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) von 70 °C nach der unten aufgeführten Formel berechnet.

$$T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$$

Die PCR-Ansätze wurden, in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase, nach dem folgenden Schema vorbereitet :

50-150 ng	DNA-Template	50-150 ng	DNA-Template
1 µl	Primer 1 (20 pmol)	2 µl	Primer 1 (20 pmol)
1 µl	Primer 2 (20 pmol)	2 µl	Primer 2 (20 pmol)
5 µl	PCR-Puffer (10x)	5 µl	PCR-Puffer (10x)
10 µl	Q-Solution (5x)	2 µl	dNTP-Mix (10 mmol)
1 µl	dNTP-Mix (10 mmol)	1 U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
0,5 U	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>ad</i> 50 µl	H <sub>2</sub> O
<i>ad</i> 50 µl	H <sub>2</sub> O		

Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler wurden an die entsprechende Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Primer angeglichen, wobei die Annealing Temperatur 5-10 °C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur lag. Alle PCR Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben unter den folgenden standardisierten Bedingungen durchgeführt:

<b>1. Segment:</b> (1 Zyklus)	95 °C,	120 s (Denaturierung)
<b>2. Segment:</b> (30 Zyklen)	94 °C,	60 s (Denaturierung)
	55 °C,	60 s (Annealing)
	72 °C,	120 s (Extension)
<b>3. Segment:</b> (1 Zyklus)	72 °C,	300 s
<b>4. Segment:</b>	4 °C,	unendlich (Ende)

**Kolonie-PCR.** Anstelle aufgereinigter DNA wurden bei der Kolonie-PCR bakterielle Lysate als Template verwendet. Zur Herstellung der *E. coli* Lysate wurden jeweils 1-5 Klone einer frischen Reinkultur in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und mittels 10 minütiger Inkubation bei 95 °C aufgeschlossen. Um Lysate von *S. pyogenes* Kulturen herzustellen wurden 1-10 Kolonien pro Stamm in jeweils 100 µl NaOH (50 mM) eingerührt, für 5 min. bei 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Nach der Zugabe von 16 µl TrisHCl (0,1 M, pH 8) wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation für 2 min bei 18.000 g abgetrennt, der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Pro PCR-Ansatz wurden 2-10 µl der vorbereiteten Suspension als Template eingesetzt.

## 7.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des „DYEnamic ET Terminator cycle sequencing kit“. Die Proben wurden entsprechend der Herstellerangaben mit einem automatischen Sequenziergerät (Modell 373A, ABI) aufgetrennt und detektiert. Als Template diente entweder Plasmid-DNA oder aus einem Agarosegel aufgereinigte PCR-Produkte, welche in einer Konzentration von 100 ng pro Ansatz verwendet wurden. Die Sequenz-Reaktionen wurden dabei wie folgt präpariert:

100	ng	Template-DNA
1	µl	Primer (20 pmol)
4	µl	Premix (dNTPs, ddNTPs, DNA-Polymerase)
4	µl	Premix-Puffer (5x)
x	µl	H <sub>2</sub> O
<hr/>		
20	µl	Endvolumen

Die Bedingungen für die Amplifikation wurden wie folgt gewählt:

<b>1. Segment:</b> (1 Zyklus)	94 °C,	36 s	(Denaturierung)
<b>2. Segment:</b> (30 Zyklen)	94 °C,	15 s	(Denaturierung)
	48 °C,	15 s	(Annealing)
	60 °C,	70 s	(Extension)
<b>3. Segment:</b> (1 Zyklus)	60 °C,	300 s	
<b>4. Segment:</b> (1 Zyklus)	10 °C,	10 s	
<b>5. Segment :</b> (1 Zyklus)	4 °C,	unendlich	(Ende)

Reste von Oligonukleotiden und Premix wurden nach Abschluß der Reaktion mittels Sephadex-Säulenfiltration (DyeEx<sup>TM</sup> Dye-Terminator Removal System, Qiagen), entsprechend der Herstellerangaben, abgetrennt und das DNA haltige Eluat in einer Speed Vac getrocknet. Die Proben wurden bis zu Analyse dunkel, bei -20 °C gelagert.

## 7.6 Site-Directed-Mutagenesis

Die „Site-Directed-Mutagenesis“ wurde entsprechend der Methode von Higuchi *et al.*, 1988 durchgeführt, mit der Einzelbasespaarsubstitutionen zwischen synthetischen Oligonukleotiden und Template DNA mittels PCR amplifiziert werden. Die zielgerichteten Punktmutationen werden dabei in zwei Schritten erzeugt. Im Ersten werden mittels PCR zwei überlappende Fragmente unter Verwendung der substituierten Oligonukleotide amplifiziert, gefolgt von einer Fusions-PCR durch die das gesamte mutagenisierte DNA Fragment generiert wird. Die Fusions-PCR besteht dabei ebenfalls aus zwei Schritten. Der Erste dient der sogenannten Primerextension, bei der die beiden überlappenden PCR Fragmente aneinander gelagert und die Enden durch Zugabe von DNA-Polymerase und dNTPs aufgefüllt werden. Im zweiten Schritt nutzt man das so erzeugte DNA Fragment unter Zugabe der gewünschten Oligonukleotidprimer als Template, um das Gesamte PCR Fragment zu amplifizieren.

Die Fusions-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

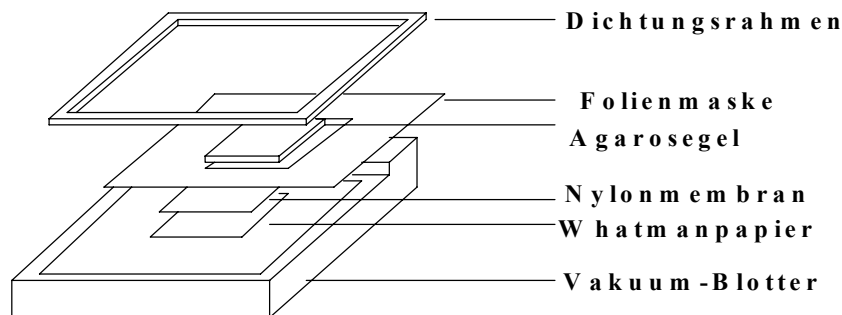
<b>1. Segment:</b> (1 Zyklus)	95 °C,	120 s	(Denaturierung)
<b>2. Segment:</b> (2 Zyklen)	94 °C,	60 s	(Denaturierung)
	70 °C,	60 s	(Annealing)
	72 °C,	120 s	(Extension)
Zugabe der Oligonukleotide			
<b>3. Segment:</b> (30 Zyklen)	94°C,	60 s	(Denaturierung)
	55 °C	90 s	(Annealing)
	72 °C	90 s	(Extension)
<b>4. Segment:</b>	4 °C,	unendlich	(Ende)



## 7.7 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse wurde im Rahmen dieser Arbeit, entsprechend der Methode von Southern, 1979; 1975 zum Nachweis des *grab*-Gens in *S. pyogenes* verwendet. Zu diesem Zweck wurde die chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten und die Fragmente mittels AGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und mit Maßeinheit zu Dokumentationszwecken fotografiert. Im Anschluß erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran mittels Unterdruck an einer Vakuum-Blot-Apparatur. Der Blot wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers wie in (Abb. 33) dargestellt aufgebaut:

**Abb. 33: Schematische Darstellung eines Southern Blot Aufbaus**



**Aufbau des Southern Blots.** Zum Aufbau wurden nacheinander das in SSC (2x) getränkte Whatmanpapier und die ebenfalls in SSC (2x) getränkte Nylonmembran auf eine poröse Platte luftblasenfrei aufgelegt und mit einer Folienmaske abgedeckt. Der Ausschnitt der Maske war dabei etwas kleiner bemessen als das darauf aufgelegte Agarosegel. Für den Transfer wurde ein Unterdruck von 50 mbar angelegt und das Gel zunächst für 15 min mit Depurinierungspuffer überschichtet. Im Anschluß daran folgten Denaturierungspuffer (20 min), Neutralisierungspuffer (15 min) und Transferpuffer (1 h), wobei durch die wiederholte Zugabe von Puffer ein Austrocknen des Gels vermieden wurde. Nach Abschluß des Transfers wurde die DNA auf der Membran durch 1 min UV-Bestrahlung bzw. 30 min „Backen“ bei 42 °C zwischen zwei Lagen Whatman Papier fixiert.

**Southern Blot Entwicklung.** Zur Entwicklung wurde die geblottete Nylonmembran zunächst für 1 h bei 62 °C mit bereits vorgewärmter Prähybridisierungslösung abgesättigt (20 ml/100

cm<sup>2</sup> Membran) und über Nacht bei 62 °C im Hybridisierungsschrank mit (15 ml/100 cm<sup>2</sup> Membran) der Hybridisierungslösung (1 µl DIG-markierte Sonde/ml) inkubiert. Die Sonde wurde mittels PCR, entsprechend der Herstellerangaben von Boehringer, unter Verwendung Digoxigenin (DIG) markierten dNTPs hergestellt. Nach Kontrolle des PCR-Produkts durch AGE wurde die Sonde vor Gebrauch zunächst für 5 min auf 95 °C denaturiert und direkt im Anschluß auf Eis gestellt. Unspezifische gebundene DNA-Fragmente wurden durch Waschen der Membran für 2x 5 min mit Waschpuffer 1 bei 42 °C, 2x 15 min mit Waschpuffer 2 bei 68 °C und 2x für 5 min mit Waschpuffer 3 bei RT entfernt. Im Anschluß daran wurde die Membran für 30 min bei RT in Antikörperkonjugatpuffer und für weitere 30 min in Antikörperkonjugatlösung inkubiert. Das mit alkalischer Phosphatase konjugierte anti-DIG IgG wurde dabei in einer Konzentration von 1:5000 eingesetzt. Ungebundene Antikörper wurde durch 3x Waschen für 5 min bei RT mit Waschpuffer 3 entfernt. Der enzymatische Nachweis gebundener AP-konjugierter Antikörper erfolgte durch die Zugabe von CDP-Star als Substrat entsprechend der Herstellerangaben mit dem positive Fragmente aufgrund ihrer Chemolumineszenz durch Autoradiographie sichtbar gemacht wurden.

## 7.8 Klonierung

PCR Produkte für die Klonierung wurden im Verlauf dieser Arbeit mittels synthetischer Oligonukleotide, mit zusätzlichen 5'-terminal eingefügten Restriktionsschnittstellen (Tab. 13) amplifiziert. Die generierten Fragmente wurden im Agarosegel kontrolliert und eluiert, um Verunreinigungen durch Template DNA zu vermeiden, und unter Berücksichtigung der Herstellerangaben in das pCR2.1 bzw. pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor System subkloniert. Das Prinzip beruht dabei auf der terminalen Transferaseaktivität der eingesetzten DNA-Polymerase 3'-A-Überhänge zu synthetisieren, welche mit den 3'-T-Überhängen der linearisierten Vektor DNA ligieren können. Subklonierte Fragmente konnten somit im Anschluß mittels spezifischer Restriktionsenzyme ausgeschnitten, Gel eluiert und schließlich in den ebenfalls linearisierten Expressionsvektor ligiert werden. Die für die Restriktion der PCR-Fragmente verwendeten Schnittstellen sind in Tab. 12 aufgeführt. pQE-30 wurde dementsprechend entweder mittels *Bam*HI/*Kpn*I oder aufgrund einer fehlenden *Eco*RI Schnittstelle *Bam*HI/*Sma*I linearisiert. Da *Sma*I keine überhängenden Enden erzeugt wurde die überhängende *Eco*RI Schnittstelle des zu klonierenden Fragments wie in V 7.3.4 beschrieben Klenow aufgefüllt. Der Expressionsvektor pGEX-6P-1 wurde mittels *Bam*HI/*Eco*RI geschnitten. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, daß das

Leseraster des zu klonierenden Fragments nicht verschoben wurde. Positive Klone wurden mittels Sequenzierung auf Vollständigkeit sowie mögliche Verschiebungen des Leserasters überprüft.

### 7.9 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* für die Elektroporation

Für die Transformation der pGEX-6P-1 Konstrukte wurden elektrokompetente *E. coli* XL1-blue und für pQE-30 Derivate *E. coli* M15[pREP4] als Wirt eingesetzt. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden zunächst 250 ml LB-Medium in einem Erlenmeyer Kolben (ohne Schikane, zur Vermeidung von Schaumbildung) mit 2,5 ml der entsprechenden über Nacht Kultur angeimpft und bei 37 °C, 110 rpm bis zum Erreichen einer  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,6$  inkubiert. Die Suspension wurde danach in einen Zentrifugenbecher überführt und für 30 min auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Schritte bis zum Einfrieren der Zellen in flüssigem N<sub>2</sub> erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis.

Im Anschluß daran wurden die Zellen für 15 min bei 2610 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert, wobei das verbliebene Pellet zunächst im gleichen Volumen deionisiertem eiskalten H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert wurde. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 0,4 Vol H<sub>2</sub>O und 0,02 Vol 10 % Glycerin wurden die nunmehr kompetenten Zellen in 0,002 Vol 10 % Glycerin aufgenommen, in Aliquots à 40 µl in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Transformation der elektrokompetenten Zellen erfolgte in Anlehnung an die von Potter, 1988 beschriebene Methode. Dazu wurden die elektrokompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und anschließend in eine ebenfalls auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette übertragen. Die Elektroporation der Zellen erfolgte unter Verwendung eines Gene Pulser bei einer Einstellung von 25 µF und 2,5 V sowie eines Pulse Controller mit einer Einstellung von 200 Ω. Im Anschluß wurde die Zellsuspension in 500 µl vorgewärmtes LB-Medium überführt für 1 h bei 37 °C inkubiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Der Nachweis positiver Klone erfolgte durch Kolonie-PCR oder der Analyse der aufgereinigten Plasmid DNA.

## 8. Arbeiten mit Proteinen

### 8.1 Induktion und Expression

Zur Überexpression wurden entsprechende Volumina LB-Medium (mit Antibiotikum) aus zuvor angelegten über Nacht Kulturen angeimpft und bis zu einem Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,6 bei 37 °C und 110 rpm inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion rekombinanter His-Tag- bzw. GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiteren 5-6 h Inkubation bei 30 °C und 110 rpm konnten die Bakterien mittels Zentrifugation pelletiert und bei -20 °C bis zum Zellaufschluß gelagert werden. Die Kontrolle der Expression erfolgte sowohl durch SDS-PAGE (V 8.4) als auch Immunoblot Analyse (V 8.4.1).

### 8.2 Herstellung bakterieller Lysate

**8.2.1 *E. coli*.** Zur Herstellung von *E. coli* Lysaten wurden die Bakterien aus 1 ml Kultur in 200 µl Tris HCl (0,1 M, pH 8,0) und 200 µl Probenpuffer resuspendiert, für 3 min bei 99 °C aufgeschlossen und anschließend auf Eis abgekühlt. In der folgenden SDS-PAGE wurden 10-15 µl des Lysats pro Spur aufgetragen.

**8.2.2 *S. pyogenes*.** Zur Herstellung bakterieller Lysate von *S. pyogenes* wurden 20 ml Suspension aus der exponentiellen bzw. 10 ml aus der stationären Wachstumsphase entnommen zentrifugiert, mit 1 ml TrisHCl (10 mM, pH 7,4) gewaschen und in 500 µl des gleichen Puffers resuspendiert. Die Zellwandaufschluss erfolgte durch 1 h Inkubation bei 37 °C mit Mutanolysin (5000 U/ml). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet 250 µl Tris HCl (0,1 M, pH 8,0) und 250 µl Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 99 °C denaturiert, und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

**8.2.3 French Press.** Der Aufschluß von induzierten *E. coli* zur Proteinaufreinigung erfolgte mittels French Press. Zu diesem Zweck wurden die zuvor eingefrorenen Pellets in PBS resuspendiert (10 ml / Pellet aus 1 l Kultur), erneut für 5000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und im Anschluß in einem möglichst geringen Volumen (7-10 ml / 1 l Kulturvolumen) Lysispuffer 1 (His-Tag-Aufreinigung) bzw. PBS (GST-Aufreinigung) resuspendiert. Beide Puffer enthielten Proteaseinhibitoren in Form von PMSF (2 mM) oder Protease Inhibitor Cocktail entsprechend der Herstellerangaben. Um einen möglichst effizienten Aufschluß zu erreichen wurde der

Vorgang der French Press zweimal wiederholt. Die Trennung von Zelltrümmern und Proteinhaltigem Überstand erfolgte mittels 15 min Zentrifugation bei 15.000 rpm (SS-34 Rotor). Um die Degradation des Proteins zu vermeiden, wurden alle Schritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

### 8.3 Affinitätschromatographie

Alle Aufreinigungen wurden an einer Econo-System Affinitätschromatographie Anlage von BioRad durchgeführt. Die Kopplung von Proteinen an das entsprechende Säulenmaterial erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min, während die Waschschrritte als auch die Elution bei 2 ml/min durchgeführt wurden. Der Durchfluß wurde photometrisch bei einer OD<sub>280 nm</sub> gemessen und aufgezeichnet.

**8.3.1 Aufreinigung von His-Tag Proteinen.** Die Aufreinigung von His-Tag gekoppelten Proteinen erfolgte an Ni-NTA Agarose wobei 4 ml Säulenmaterial für 1 l Kulturvolumen eingesetzt wurden. Die Aufreinigung wurde entsprechend der Angaben von Qiagen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Aufgrund einer schwachen Bindung der Protein GRAB Derivate mußte die Imidazolkonzentration des Waschpuffers (2), (V 3.) auf 10 mM reduziert werden. Die Elution der entsprechendenden Proteine erfolgte unter Zugabe von Elutionspuffer (3) (V 3.) und wurde in drei Fraktionen aufgefangen, dialysiert, gemessen und mittels SDS-PAGE kontrolliert. Zur Lagerung wurden 1 ml Aliquots bei -20 °C eingefroren.

**8.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.** Die Aufreinigung von Glutathion S-Transferase (GST-) gekoppelten Fusionsproteinen erfolgte entsprechend der Herstellerangaben von Amersham Pharmacia Biotech unter Verwendung von Glutathion Sepharose 4B (4 ml/1 l Kulturvolumen). Dazu wurde das Säulenmaterial zunächst mit PBS äquilibriert und anschließend das aufzureinigende Protein gekoppelt. Verunreinigungen wurden durch extensives Waschen mit PBS entfernt. Die Elution erfolgte mit Glutathionpuffer (V 3.) und wurde wie bereits beschrieben prozessiert. Um das verbliebene Säulenmaterial zu regenerieren wurde die Sepharose mehrfach für 5 min mit Regenerationspuffer (1) und (2), (V 3.) gespült.

**8.3.3 IgG Aufreinigung mittels Protein A.** Die Aufreinigung von polyklonalem IgG aus Serumfraktionen erfolgte unter Verwendung von Sepharose gekoppeltem Protein A

entsprechend der Herstellerangaben von Amersham Pharmacia Biotech. Ausgehend von einer Konzentration von 8-16 mg IgG/ml Serum (Goldsby *et al.*, 2000), und einer Bindungskapazität von 5 mg IgG/ml Sepharose wurden 5 ml Serum über 5 ml Säulenmaterial gereinigt. Dazu wurde das Säulenbett zuerst mit PBS gewaschen, anschließend das Serum über die Säule gegeben, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde und erneut mit PBS bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen wurde. Die saure Elution der IgG Fraktion erfolgte unter Zugabe von Glycin-HCl (0,1 M, pH 3,0). Um die Bindungseigenschaft der Antikörper wieder herzustellen wurde der pH Wert durch Titration mit TrisHCl (1 M, pH 8,0) in den physiologischen Bereich angehoben.

Die Konzentration der eluierten IgG Fraktion wurde photometrisch bestimmt, wobei eine  $OD_{280\text{ nm}} = 1$  ca. 0,8 mg IgG/ml entspricht. Alle Antikörperfraktionen wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert.

**8.3.4 Kopplung von Proteinen an aktivierte CNBr-Sepharose.** Die Herstellung proteingekoppelter Säulen zur Affinitätschromatographie erfolgte mit CNBr-Sepharose als Trägermaterial (1 g Sepharose entspricht dabei 3,5 ml Säulenmaterial). Zur Kopplung wurden 1 g Sepharose in 200 ml HCl (1 mM) für 15 min zum Quellen gebracht und auf eine Glasfritte übertragen, 4x mit HCl (1 mM) und 1x mit Kopplungspuffer (V 3.) gewaschen. Das so aktivierte Trägermaterial wurde im nächsten Schritt in 5 ml Kopplungspuffer/g Sepharose aufgenommen und in einem geschlossenen Gefäß mit 5-10 mg lyophilisiertem Protein/g Sepharose für 2 h bei RT auf einem Rolltisch inkubiert. Das Protein wird bei diesem Schritt kovalent an den Träger gebunden. Anstelle von Lyophilisat wurde auch gelöstes, gegen Kopplungspuffer dialysiertes Protein verwendet. Nach Abschluß der Kopplung wurden die freien Bindungsstellen auf der Matrix durch Zugabe von 0,75 g Glycin/g Sepharose und weitere 2 h Inkubation bei RT abgesättigt. Um Rückstände von ungebundenem Protein bzw. Glycin zu entfernen wurde das Material erneut 4-5x mit jeweils 100 ml Kopplungspuffer/g Sepharose und 1x mit PBS gewaschen sowie in PBS mit Na-Azid bei 4 °C gelagert.

### 8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse bakterieller Proteingemische als auch aufgereinigter Proteine wurde das von Laemmli, 1970 beschriebene System der diskontinuierlichen Gelelektrophorese verwendet. Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel fokussiert und in dem darauffolgenden 10-16 %igen Trenngel entsprechend ihrer Größe separiert. Für die Elektrophorese wurde das Mini Protean II System der Firma Bio Rad eingesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer angelegten Spannung von 200 V. Verwendete Proteingrößenstandards werden im Anhang aufgeführt und sind zusätzlich in den Abbildungen vermerkt. Proteingele wurden im Anschluß an die Elektrophorese entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (V 3.) oder für die Immunblotanalyse (V 8.4.1) verwendet.

<b>Trenngel (4 ml)</b>	<b>4 %</b>		
H <sub>2</sub> O	2,5 ml		
Sammelgelpuffer (0,5 M, pH 6,8)	1,0 ml		
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	0,5 ml		
10 % SDS	40 µl		
10 % APS	20 µl		
TEMED	4 µl		
<hr/>			
<b>Sammelgel (7,5 ml)</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>16 %</b>
H <sub>2</sub> O	3,0 ml	2,5 ml	1,5 ml
Trenngelpuffer (1,5 M, pH 8,8)	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	2,5 ml	3,0 ml	4,0 ml
10 % SDS	75 µl	75 µl	75 µl
10 % APS	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

#### 8.4.1 Immunblot

Die Western Blot Analyse (Towbin *et al.*, 1979; Gültekin *et al.*, 1988) ist eine Methode zur elektrophoretischen Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf positiv geladene Membranen und erlaubt den immunologischen Nachweis von Proteinen durch Bindung spezifischer Antikörper oder markierter Liganden an das Protein. Zur Vorbereitung wurde

eine Nylonmembran bestehend aus PVDF (Polyvinylidendifluorid) durch Überschichten mit Methanol aktiviert, gründlich mit Wasser gespült und anschließend mit 4 gleich großen Stücken Whatman Papier in Blottingpuffer getränkt. Die Membran sollte dabei das Gel an allen Seiten um ca. 3 mm überragen.

Der elektrophoretische Transfer erfolgte unter Verwendung des Transblot-SD Semidry Transfer Cell Systems. Dazu werden zwei Lagen des in Blot-Puffer getränkten Filterpapiers blasenfrei auf die Kathode des Geräts gelegt. Anschließend die Membran, das Gel und zwei weitere Lagen Filterpapier ebenfalls luftblasenfrei darauf aufgeschichtet. Durch das Auflegen der Anode wird der Apparat geschlossen und der Transfer für ca. 20 min. bei einer angelegten Spannung von 15 V durchgeführt. Die Membran kann nach Abschluß des Transfers direkt entwickelt oder trocken bei RT gelagert werden.

Zum Immunologischen Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurde die aktivierte Membran zunächst in 10 mM PBS mit 5 % Magermilch für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten proteinspezifische Antikörper in PBS für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS für jeweils 5 min konnte der primäre Antikörper unter Zugabe eines zweiten (Horseradish-Peroxidase konjugierten Antikörpers, 1:5000 verdünnt in PBS), nachgewiesen werden. Nach erneutem Waschen (3x à 5 min in PBS) erfolgte die Detektion des sekundären Antikörpers unter Zugabe von 4-Chloro-1-Naphtol (1 mg/ml) als Substrat und 0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 10 mM PBS.

**8.4.2 Ligandenassay.** Der Liganden Assay wurde für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen eingesetzt. Dazu wurden zunächst unspezifische Bindungen auf der Membran durch die Zugabe von PBS mit 5 % Magermilch (V 8.4.1) blockiert und anschließend mit dem Protein-Liganden (4 µg/ml PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Proteins erfolgte wie bereits für den Immunoblot beschrieben.

**8.4.3 Analyse Membran synthetisierter Peptide.** Die Analyse synthetischer membrangekoppelter Peptide erfolgte durch Liganden Bindungstests in drei Schritten. Zunächst wurden unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers, danach die des primären und sekundären Antikörpers und in einem dritten Schritt die Ligandenbindung an die synthetischen Peptide bestimmt. Bereits gebundene Komponenten wurden vor jedem neuen Versuch entfernt.

In der Durchführung wurde die Membran zunächst, zur besseren Benetzung der Oberfläche mit Puffer, mit einigen Tropfen EtOH angefeuchtet und 3x mit TBS (V 3) gewaschen. Alle Waschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, für 10 min bei RT mit ca. 10 ml Lösung



auf einem Inkubationsroller. Nach Aktivierung der Membran wurden unspezifische Bindungen mit 8 ml Blockierungspuffer (V 3.) über Nacht abgesättigt und anschließend 1x mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Protein-Liganden (40 µg/ml) erfolgte für 4,5 h in TBST. Ungebundenes Protein wurde durch 3x Waschen mit TBST entfernt. Zur Detektion wurden spezifische gegen den Liganden gerichtete Antikörper 1:100 in Blockierungspuffer verdünnt und die Membran für weitere 3,5 h inkubiert. Nach erneutem 3x Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper (1:200 in Blockierungspuffer) und für 1,5 h inkubiert. Nach Entfernung der ungebundener Rückstände durch extensives Waschen mit TBST konnte der Assay wie in V 8.4.1 beschrieben entwickelt werden.

Die Entfernung bereits gebundener Komponenten erfolgte durch 2x Waschen mit H<sub>2</sub>O, 1x DMF, 1x DMF (wobei das Inkubationsgefäß in ein Ultraschallbad gestellt wurde bis alle Farbrückstände vollständig verschwunden waren), 1x DMF (Nachwaschen), 3x H<sub>2</sub>O, 3x Puffer A (davon jeweils 5 min schwenkend und 5 min im Ultraschallbad bei 40 °C), 3x Puffer B und schließlich 3x mit EtOH. Die Membran konnte daraufhin getrocknet und bei –20 °C gelagert oder erneut beprobt werden.

## 8.5 Quantifizierung von Proteinen

**Photometrische Quantifizierung.** Die photometrische Quantifizierung von Proteinen erfolgte nach Gill *et al.*, 1989 bei einer OD<sub>280 nm</sub> unter Verwendung des proteinspezifischen Quotienten, welcher mittels ExPASy aus der Aminosäuresequenz bestimmt wurde.

**Biochemische Quantifizierung.** Die biochemische Quantifizierung erfolgte nach Bradford, 1976 mit BSA als Standart und unter Verwendung des Roti-Nanoquant-System von Roth.

## 9. Bindungstests mit löslichen Proteinen

### 9.1 Radioaktive Markierung von Proteinen mit <sup>125</sup>Iod

Die radioaktive Markierung von Protein Liganden mit <sup>125</sup>I erfolgte in Anlehnung an das von Rehm *et al.*, 1992 beschriebene Iodierungsprotokoll, bei dem Tyrosinreste unter Verwendung von Chloramin-T iodiert werden. Durch den Zerfall von Chloramin-T in wässriger Lösung zu

Hypochlorsäure wird  $^{125}\text{I}^-$  zu  $^{125}\text{I}^+$  oxidiert, welches mit der anionischen Form des Tyrosins zu  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin reagieren kann.

Für die Markierung wurden 100  $\mu\text{l}$  Protein (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in PB-Puffer), in ein silikonisiertes Glasröhrchen überführt und nach Zugabe von 350  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{I}$  (ca. 4  $\mu\text{l}$ ) pro Protein mit 20  $\mu\text{l}$  Chloramin-T (1 mg/ml) für 1 min oxidiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 20  $\mu\text{l}$  Na-Metabisulfid (1 mg/ml) beendet und mit 2,5 ml PBST verdünnt. Aufgrund ihrer Instabilität wurden sowohl Chloramin-T als auch Na-Metabisulfid erst kurz vor der Reaktion in PB-Puffer gelöst. Die Abtrennung von freiem ungebundenem  $^{125}\text{I}$  erfolgte über PBST äquilibrierte PD-10 Säulen (25 ml PBST pro Säule), wobei das  $^{125}\text{I}$ /Protein Gemisch auf die Säule gegeben, der Durchfluß verworfen und das Protein durch Zugabe von 3,5 ml PBST eluiert wurde. Die so markierten Liganden konnten in Aliquots stabil für 1-2 Wochen gelagert werden.

Zur Bestimmung der Protein spezifischen Aktivität wurde 1  $\mu\text{l}$  der Suspension vor der Säulenaufreinigung entnommen, mit 20  $\mu\text{l}$  FCS gemischt und durch Zugabe von 1 ml 10 % TCA gefällt. Nach Zentrifugation bei 18.000 g für 3 min konnte der Überstand verworfen und die verbliebene Aktivität im Pellet gemessen werden. Proteine deren Kopplungseffizienz unter 50 % lag wurden verworfen.

## 9.2 Bindungsversuche mit *S. pyogenes*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von humanen  $^{125}\text{I}$ -markierten Proteinen an klinische Gruppe A Streptokokken Isolate (GAS) getestet. Zu diesem Zweck wurden 50 ml/THY Kulturen direkt aus dem Glycerol angelegt und nach 16 h Inkubation bei 37 °C, 110 rpm mittels Zentrifugation für 10 min bei 4500 g pelletiert, mit 5 ml PBST gewaschen und in 0,5-1 ml PBST resuspendiert. Die Bakterien wurden auf eine Transmission (T) von 10 % mit PBST eingestellt, was einer durchschnittlichen Konzentration von  $5 \times 10^8$  Streptokokken/ml entspricht. Der Ligand wurde auf 70.000–100.000 cpm/20  $\mu\text{l}$  in PBST eingestellt und mit 250  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension ( $1,25 \times 10^8$  KBE) für 45 min bei RT stehend inkubiert. Nach Entfernung der im Überstand verbliebenen, ungebundenen Proteine, durch Zugabe von 1 ml PBST und anschließender Zentrifugation, erfolgte die Bestimmung der Aktivität im Pellet mit einem  $\gamma$ -Spektrometer. Die Bindungseffizienz wurde durch einen Vergleich mit dem 100 % Werts aus einer parallel durchgeführten TCA-Fällung des zugegeben  $^{125}\text{I}$ -markierten Protein-Liganden (20  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -Ligand, 20  $\mu\text{l}$  FCS, 1 ml TCA) berechnet. Alle Ergebnisse wurden aus Doppel- oder Dreifach-Werten gemittelt.

### 9.3 Inhibitionsversuche

Die Inhibitionsversuche dienten der Charakterisierung von Rezeptor/Ligand Interaktionen. Dabei wurde der  $^{125}\text{I}$ -markierte Protein-Ligand durch die Vergabe steigender Konzentrationen unmarkierten Proteins (6,6 ng bis 100  $\mu\text{g}$ ) von seiner Bindungsstelle verdrängt, und Rückschlüsse aus der daraus resultierenden Sättigungskurve in Bezug auf Affinität und Spezifität der Bindung gezogen.

Die Durchführung erfolgte indem zunächst 100  $\mu\text{l}$  des Inhibitors mit 20  $\mu\text{l}$  des  $^{125}\text{I}$ -markierten Liganden (70.000-100.000 cpm/20  $\mu\text{l}$ ) gemischt und anschließend mit 300  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension ( $1,5 \times 10^8$  KBE) für 45 min bei RT inkubiert wurden (V 9.2). Nach Zugabe von 1 ml PBST und Zentrifugation für 18.000 g für 7 min konnte die verbliebene Aktivität im Pellet bestimmt und mit der absoluten Aktivität in 20  $\mu\text{l}$  (100 % Wert) verglichen werden.

## 10. Immunologische Methoden

### 10.1 Immunisierung

**10.1.1 Herstellung polyklonaler anti-GRAB Antikörper.** Die Generierung großer Antikörpermengen erfolgte durch Eurogentec (Belgien). Dazu wurden Kaninchen, dem Standardprotokoll folgend, intradermal mit 50  $\mu\text{g}$  aufgereinigtem Protein in einer 1:1 Emulsion bestehend aus Antigen und „complete Freund’s Adjuvant“ (c.F.A.) immunisiert und an Tag 14, 28 und 56 mit einem Homogenisat aus 50  $\mu\text{g}$  Protein und „incomplete Freund’s Adjuvant“ (i.c.F.A.) geboostet. Die im Serum enthaltene polyklonale IgG Fraktion wurde mittels Protein A Sepharose und GST-A gekoppelt an CnBr aufgereinigt (V 8.3.3; 8.3.4) und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Das Preimmunserum wurde vor der ersten Immunisierung entnommen.

**10.1.2 Immunisierung von Mäusen.** Für die Induktion als auch Charakterisierung einer Immunantwort wurden BALB/c sowie C3H/HeN Mäuse mit einem Alter von 8 Wochen intraperitoneal (i.p.) immunisiert. Pro Tier wurden 100  $\mu\text{l}$  einer Emulsion bestehend aus 20  $\mu\text{g}$  Antigen in 50  $\mu\text{l}$  PBS und 50  $\mu\text{l}$  i.c.F.A verabreicht. Der 1. und 2. Boost erfolgte nach 7 und 14 Tagen mit jeweils 20  $\mu\text{g}$  Protein in 100  $\mu\text{l}$  PBS. Um die protektive Wirkung des Antigens zu testen wurden die mit dem Antigen immunisierten Tiere, 14 Tage nach dem 2. Boost über die Haut mit *S. pyogenes* infiziert (V 11.1).

**10.1.3 Serumgewinnung aus Blut.** Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene. Um eine Immunsuppression zu vermeiden wurden nicht mehr als 100 µl Blut pro Tier und Zeitpunkt entnommen. Die Agglutination erfolgte für 1 h bei 37 °C (alternativ für 3 h bei RT), bis das Serum als klarer Überstand zu erkennen war. Anschließend konnten die Proben auf Eis abgekühlt und der Serumüberstand durch Zentrifugation für 5 min bei 10.500 g separiert werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

## 10.2 ELISA

Der ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) wurde für den Nachweis antigenspezifischer IgG Fraktionen in Serum verwendet. Dazu wurden zunächst Polysorb 96-Well Mikrotiterplatten mit 50 µl/Well des Antigens in Coating-Puffer (4 µg/ml) über Nacht bei 4 °C beschichtet und im Anschluß 4x mit PBST gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch die Inkubation mit 1 % BSA in PBS (PBSA), 200 µl/Well, für 1 h bei RT blockiert und überschüssiges BSA durch 2x Waschen mit PBST entfernt. Alternativ wurde auch 10 % FCS in PBS eingesetzt. Im Anschluß erfolgte die Zugabe von 100 µl/Well der 1:50 bzw. 1:100 in PBSA verdünnter Serumproben. Alle Werte wurden aus Dreifachbestimmungen gemittelt und mit Kontrollen verglichen. Die Inkubation erfolgte dabei entweder über Nacht bei 4 °C bzw. für 2 h bei 37 °C. Nach 4x Waschen mit PBST erfolgte der Nachweis von gebundenem IgG mittels anti-IgG Biotin konjugierter Antikörper (1:20.000 in PBSA) 100 µl/Well für 1 h bei 37 °C, welche wiederum nach 5-6x Waschen mit PBST, mittels Streptavidin-PO (1:1000 in PBSA), 100 µl/Well für 45 min bei RT detektiert wurden. Als Substrat für die Peroxidase diente ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 ml Substratpuffer plus 1 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 100 µl/Well.

Der Nachweis von Antigen spezifischem IgG aus Patientenseren erfolgte direkt, mittels Maus anti-Human IgG Peroxidase-konjugierter Antikörper nach dem oben beschriebenen Protokoll. Die Auswertung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 405 nm nach einer 30 bis 60 min Entwicklungsdauer im ELISA-Reader.

## 10.3 FACS Analyse

Die Unterscheidung von Makrophagen und Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) erfolgte mittels FACS Analyse unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-Maus F480 und PE-konjugierten Anti-Maus RB6 Antikörpern.

## 10.4 Phagozytose Assays

**10.4.1 Isolierung intraperitonealer Makrophagen aus der Maus.** Die Isolierung intraperitonealer Makrophagen für Phagocytose Versuche erfolgte durch eine Peritoneal-Lavage mit 2x 5 ml eiskaltem DMEM-Hepes supplementiert mit 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Um eine ausreichende Menge an Zellmaterial zu erhalten (ca.  $2,5 \times 10^7$  Zellen) wurden pro Versuch jeweils zwei Mäuse prozessiert.

Die extraktierten Makrophagen wurden in einem sterilem 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) gesammelt, die Zellzahl nach Trypan Blau Färbung mittels Auszählen in einer Neubauer Kammer bestimmt (50 µl Zellsuspension plus 50 µl Trypan Blau) und die Konzentration nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm in einem 15 ml Röhrchen auf  $10^6$  Zellen/ml mit Medium (s.o.) eingestellt. Für anschließende Infektionsversuche wurden 500 µl/Well einer 24-Well Zellkultur-Platte ausgesäht und über Nacht, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgten alle Schritte auf Eis, um ein Adhären der Makrophagen an die Reaktionsgefäße zu vermeiden. Rückstände von Antibiotika wurden einige Stunden vor Versuchsbeginn durch 2x Waschen mit DMEM-Hepes entfernt.

**10.4.2 Anreicherung und Isolierung von PMNs aus der Maus.** Um die Bildung von Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten anzuregen wurden Mäuse 48 h vor der Isolierung mit Carrageenan behandelt. Dazu wurde 1 mg pro Maus in einem Volumen von 200 µl intraperitoneal appliziert. Die Behandlung mit Carrageenan steigert nach Ishizaka *et al.*, 1989 die Differenzierung von PMNs und vermindert die Anzahl an Makrophagen im Intraperitoneum. Die IP-Lavage erfolgte, wie in Kap. 10.4.1 beschrieben, mit 2x 5 ml DMEM Hepes mit 10 % FCS pro Maus. Isolierte PMNs wurden auf eine Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt mittels FACS Analyse kontrolliert (50 µl pro Ansatz) und bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert.

Zur Steigerung der Phagocytoseaktivität durch PMA (100 µg/ml gelöst in PBS) wurden 10 ml Zellsuspension ( $3 \times 10^6$ /ml) in eine Zellkulturschale überführt und mit 1 µl/ml PMA für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> induziert. Durch Spülen konnten die Granulozyten anschließend gelöst und auf die Reaktionsgefäße verteilt werden.

**10.4.3 Bakterizidietest.** Um die Resistenz von Bakterien gegenüber phagozytierender Zellen des primären Immunsystems zu testen wurden gleiche Volumina von ruhenden bzw. aktivierten PMNs ( $3 \times 10^6$ /ml) und Bakterien ( $3 \times 10^6$ /ml;  $3 \times 10^7$ /ml) gemischt (250 µl: 250 µl)

und für 1 h bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach abschließender Lyse in destilliertem H<sub>2</sub>O für 5 min erfolgte das Ausplattieren serieller Verdünnungen auf Blutagarplatten. Die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) wurde im Anschluß mit den KBE der Kontrolle (Bakterien in Zellkulturmedium ohne PMNs) verglichen, wobei sich die Überlebensrate aus dem Quotienten der überlebenden KBE und dem initialen Inokulum berechnet.

**10.4.4 Modifizierter Lancefield-Assay.** Im Lancefield-Assay (Lancefield, 1957) wurden Bakterien auf ihre Fähigkeit hin getestet, in unbehandeltem menschlichem Blut zu überleben. Zu diesem Zweck wurden Streptokokken in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen/ml mit PBS eingestellt. Im Anschluß erfolgte die Inkubation von 1 ml Blut mit 100 µl der Bakteriensuspension ( $5 \times 10^2$  KBE) für einen Zeitraum von 0,5-3 h bei 37 °C unter Verwendung eines Rotationsschüttlers. Das Blut wurde vor jedem Versuch frisch entnommen, entsprechend der Herstellerangaben mit Heparin versetzt und in verschließbare 3 ml Glasröhrchen aliquotiert, welche bis zur Inkubation (nicht länger als 2-3 h) bei 4 °C gelagert wurden.

## 11. Maus-Infektionsmodell

### 11.1 Infektion von Mäusen mit *S. pyogenes*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, pathogenfreien BALB/c und C3H/HeN Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen von Harlan Winkelmann bezogen. Im Infektionsmodell erfolgte die Applikation der GAS Stämme KTL3 und MR4 subkutan unter die Rückenhaut. Zu diesem Zweck wurde zuvor eine ca.  $2 \times 2$  cm<sup>2</sup> große Fläche mit einer Schermaschine rasiert und 100 µl der Bakteriensuspension mit einer 27G Nadel als Blase unter der Rückenhaut platziert. Aufgrund ihrer höheren Anfälligkeit konnte das Inokulum für C3H/HeN-Mäuse auf  $2,5 \times 10^8$  KBE festgesetzt werden, während den resistenteren BALB/c Mäusen  $5 \times 10^8$  Bakterien verabreicht wurden.

Die Entwicklung von Hautläsionen als Folge der Infektion wurde mittels einer Schieblehre im Millimeter-Maßstab in Intervallen von 24 h dokumentiert.

**11.1.1 Einstellung und Kontrolle des Inokulums.** Für die Herstellung des Inokulums wurden die Bakterien aus 50 ml Kulturvolumen (THY) bei Erreichen der mittleren exponentiellen Phase ( $OD_{600\text{ nm}} = 0,35-0,45$ ) mittels Zentrifugation für 10 min bei 4500 g geerntet, 2x mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und schließlich in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Im Anschluß wurde die Suspensionsmenge zur Einstellung der Transmission von 10 % (in 3 ml PBS) ermittelt, was einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  KBE/ml entspricht und daraus das benötigte Volumen für  $5 \times 10^9$  KBE/ml bzw.  $2,5 \times 10^9$  KBE/ml berechnet. Es gilt:

$$x \mu\text{l Suspension} / 3 \text{ ml PBS} = T \text{ 10 \%} = 5 \times 10^8 \text{ KBE/ml}$$

daraus folgt:

$$(x \mu\text{l} / 3) \times 10 = 5 \times 10^9 \text{ KBE/ml}$$

$$(x \mu\text{l} / 3) \times 5 = 2,5 \times 10^9 \text{ KBE/ml}$$

Von diesen Verdünnungen wurden schließlich á 100  $\mu\text{l}$  pro Maus appliziert was einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  bzw.  $2,5 \times 10^8$  KBE/Tier entspricht. Die Zahl und Reinheit der eingesetzten Bakterien wurde durch das Ausplattieren serieller Verdünnungen (50  $\mu\text{l}$  + 450  $\mu\text{l}$  PBS, davon 50  $\mu\text{l}$  pro Platte ausgestrichen) sowie Kontrollausstriche auf Blutagarplatten überprüft.

## 11.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl in den Organen

Für die Bestimmung der bakteriellen Belastung der Organe wurden Gruppen von jeweils 5 Tieren pro Zeitpunkt und Bakterienstamm subkutan infiziert, nach 24 h, 48 h bzw. 72 h mittels  $\text{CO}_2$  getötet sowie Leber und Milz entnommen. Zusätzlich wurde die nekrotische Rückenhaut großflächig entfernt, sowie 50  $\mu\text{l}$  Blut aus der Halsarterie entnommen und in 450  $\mu\text{l}$  PBS überführt. Haut und Organe wurden in 5 ml PBS homogenisiert und zusammen mit dem Blut in seriellen Verdünnungen auf Blutagarplatten ausplattiert. Bei Verwendung der *S. pyogenes* Mutante MR4 erfolgte zusätzliche Replika Plattierung auf Kanamycin (150  $\mu\text{g/ml}$ ), um mögliche Revertanten auszuschließen.

### **11.3 Isolierung und Charakterisierung von Phagozyten aus der Haut GAS infizierter Mäuse**

Bei diesem Versuch wurden BALB/c Mäuse mit jeweils  $5 \times 10^8$  KBE des *S. pyogenes* Stamms KTL3 oder MR4 subkutan infiziert (V 11.1) und einwandernde inflammatorische Zellen mittels subdermaler Lavage durch 2 ml DMEM-Hepes versetzt mit 10 % FCS, 1 % Glutamin, Penizillin und Streptomycin (Tab. 10) isoliert. Die Bestimmung des prozentualen Anteils von Makrophagen und neutrophiler Granulozyten erfolgte per FACS Analyse (V 10.3).

### **11.4 Reisolierung von Bakterien aus der Maus**

Zwecks Dokumentation als auch zur Passage konnten Bakterien gezielt aus den Organen, dem Blut als auch der Haut infizierter Tiere reisoliert und in 50 ml THY angereichert werden. Zu diesem Zweck wurden zuvor infizierte Tiere nach 24 h bzw. 48 h mittels  $\text{CO}_2$  getötet, die Rückenhaut vorsichtig mit einer sterilen Schere geöffnet und die Bakterien mit einem Wattestab entnommen. Die Leber konnte direkt nach Entnahme in 50 ml THY überführt werden, während das aus der Baucharterie entnommene Blut (500  $\mu\text{l}$ ) zunächst in 5 ml destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  lysiert werden mußte. Nach Erreichen der exponentiellen Phase ( $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,4-0,5$ ) wurden die Bakterien geerntet und für weitere Versuche prozessiert.

## **12. Mikroskopie**

### **12.1 Histologie**

Die Dokumentation bakteriell induzierter Hautläsionen aus BALB/c Mäusen erfolgte durch Histologie. Dazu wurden die infizierten Hautpartien 48 h nach der Infektion großflächig ausgeschnitten, in einer 10 % Phosphat gepufferten Formaldehyd-Lösung für 24 h fixiert, nach 24 h 2x mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und bis zur Einbettung in 70 % EtOH aufbewahrt.

**12.1.1 Fixierung und Einbettung der Präparate.** Das Dehydrieren und die Einbettung der Präparate in Paraffin wurde in Anlehnung an das Standardprotokoll von Machling, 1969 durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst für jeweils 45 min in 70 %, 90 %, 95 %, 2x 100 % EtOH und 2x 45 min in Xylen dehydriert sowie anschließend mit flüssigem Paraffin



bei 54 °C für 3 h infiltriert. Die so behandelten Präparate wurden abschließend in einen Paraffinblock eingebettet und mit einem Mikrotom in 5-7 µm dicke Schichten geschnitten, in einem Wasserbad mit deionisiertem oder destilliertem Wasser auf 45 °C erwärmt und schließlich auf Objektträger (Superfrost Plus) aufgebracht und über Nacht bei RT getrocknet.

**12.1.2 Azur-Eosin Färbung.** Zur Färbung der fixierten Schnitte mußten die Proben zunächst vom Paraffin befreit und rehydriert werden. Dies erfolgte durch 5 minütige Inkubationen in folgenden Lösungen: 2x in Xylene, 2x 100 % EtOH, 1x in 90 % EtOH, 1x in 70 % EtOH und dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Präparate für 1-2 h mit Azur-Eosin (V 3.) behandelt. Durch den Farbstoff werden sowohl die Zell-Granula als auch die bakterielle Zellwand und die Zellkerne blau eingefärbt. Überschüssige Farbreste wurden durch 2x Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt. Für die abschließende Fixierung wurden die Schnitte erneut durch jeweils 2 minütige Inkubation in folgenden Lösungen dehydriert: 2x in Aceton, 1x in Aceton/Xylen (1:2 gemischt), 2x in Xylen und anschließend in Entellan eingebettet.

**12.1.3 Immunfluoreszenz.** Die Immunfluoreszenz wurde für den Nachweis als auch zur Lokalisation von *S. pyogenes* in der Haut infizierter Mäuse eingesetzt. Anstelle der Azur-Eosin Färbung wurden die rehydrierten Schnitte (V 12.1.2) für 1 h bei RT mit 10 % FCS-PBS abgesättigt, anschließend mit polyklonalem anti-GAS Serum (Molinari *et al.*, 1997), 1:100 in 10 % FCS-PBS verdünnt, für 1 h bei RT inkubiert, welches mit TRITC-konjugierten anti-Kaninchen IgG (1:200 in 10 % FCS-PBS) nachgewiesen wurde. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Proben jeweils vorsichtig 2-3x in PBS gewaschen. Im Gegensatz zur Azur-Eosin Färbung wurden die Präparate nicht erneut dehydriert sondern direkt nach dem letzten Waschschrift in Moviol (V 3.) eingebettet und bei 4 °C, dunkel gelagert.

## 12.2 Elektronenmikroskopie

Proben für die Elektronenmikroskopie wurden für 1h auf Eis in 0,2 % Glutaraldehyd und 0,5 % Formaldehyd in Cacodylate Puffer, pH 6,9 (0,1 M Cacodylate, 0,09 M Sucrose, 0,01 M MgCl<sub>2</sub> und 0,01 M CaCl<sub>2</sub>) fixiert. Nach mehrfachem Waschen mit Cacodylate Puffer plus 10 mM Glycin konnten die Proben entsprechend der PLT Methode („progressive lowering of temperature“) unter Verwendung eines steigenden EtOH Gradienten, dehydriert werden. Alle Schritte wurden dabei kalt durchgeführt beginnend mit 10 % EtOH auf Eis, 30 % EtOH bei

–20 °C und 50-100 % EtOH bei –30 °C. Anschließend wurden die Proben mit Lowicryl K4M (1 Teil EtOH/ 1 Teil K4M über Nacht, 1 Teil EtOH/ 2 Teile K4M für 24 h und pures K4M für 48 h mehrfach ausgetauscht) infiltriert und unter UV-Licht (366 nm) bei –30 °C für 2 Tage, gefolgt von 2 weiteren Tagen bei RT auspolymerisiert. Zum Schneiden der Proben wurde ein Diamant Messer verwendet und die Schnitte auf Formvar beschichteten Copper Grids mit einer 300ter Maschenweite aufgebracht. Die Grids wurden mit einer 1:25 Verdünnung von anti-GRAB Antikörpern (Stocklösung 1,8 mg/ml IgG Protein) für 12 h bei 4 °C inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Protein A Gold Konjugaten (15 nm Durchmesser) für 30 min bei RT inkubiert, mit PBS plus 0,1 % Tween 20 und direkt danach mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Proben wurden an der Luft getrocknet. Das Kontrastieren erfolgte mit einer wässrigen 4 %igen Uranyl Acetat Lösung für 5 min. Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem Transmissions Elektronen Mikroskop EM910 der Firma Zeiss und einer Spannung von 80 kV.

**12.2.1 Lokalisation bakterieller Oberflächenproteine.** Zur Lokalisation von Protein GRAB auf der bakteriellen Oberfläche mittels FESEM (Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop) wurden 12,5 ml Kultur der späten exponentiellen Phase entnommen, die Bakterien für 5 min bei 5000 rpm pelletiert, mit 2 ml PBS gewaschen und in 1 ml 10 % FCS-PBS für 1 h bei 32 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl 10 % FCS-PBS resuspendiert. Die Detektion von GRAB erfolgte unter Zugabe von ProteinA gereinigtem anti-GRAB IgG (Tab. 8) in einem Verhältnis von 1:20 in 10 % FCS-PBS für 1-1,5 h bei 32 °C unter leichtem Schwenken. Rückstände ungebundener Antikörper konnten durch zweimaliges Waschen in PBS entfernt werden. Im darauffolgenden Schritt wurden die PBS gewaschenen Proben mit einer 1:25 Verdünnung von ProteinA/G Goldpartikeln mit 10 nm Durchmesser für 1 h bei 30 °C inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit PBS in 2 % Glutaraldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert.

Parallel wurden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm mit Poly-L-Lysin beschichtet, nachfolgend mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die mit Gold markierten PBS gewaschenen Bakterien wurden in 250 µl TE-Puffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 6.9) resuspendiert und jeweils 25 µl der Suspension auf ein Deckgläschen gegeben. Nach 10 min wurden die Deckgläschen in 24-Well Platten überführt, die 2 % Glutaraldehyd in TE-Puffer pro Well enthielten. Diese konnten nach 10 min mit TE-Puffer gewaschen, mit einer ansteigenden Acetonreihe (10, 30, 50, 70, 90, 100%) auf Eis entwässert und durch eine Kritische-Punkt-Trocknung mit flüssigem Kohlendioxid getrocknet werden. Die

Deckgläschen wurden anschließend auf Kohleklebefilm befestigt und dünn mit Kohle bedampft. Die Auswertung der Proben erfolgte in einem Zeiss Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop DSM982 Gemini bei einer niedrigen Beschleunigungsspannung von 1,5 – 2 kV. Bilder wurden digital auf ein MO-Medium gespeichert.

### **13. Statistische Analyse**

Statistisch signifikante Unterschiede verschiedener Proben wurden durch den Student's *t* Test (STATGRAPHICS PLUS) für unabhängige Stichproben ermittelt. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede zwischen den Gruppen bewertet die  $p < 0,05$  waren.

## VI. Literatur

**Aaij, C., and Borst, P.** (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**: 192-200.

**Åkesson, P., Sjöholm, A.G., and Björck, L.** (1996) Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J Biol Chem* **271**: 1081-1088.

**Arad, G., Levy, R., Hillman, D., and Kaempfer, R.** (2000) Superantigen antagonist protects against lethal shock and defines a new domain for T-cell activation. *Nat Med* **6**: 414-412.

**Armstrong, B.P., and Quigley, J.P.** (1999)  $\alpha_2$ -macroglobulin: An evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev Comp Immunol* **23**: 375-390.

**Barrett, A.J., and Starkey, P.M.** (1973) The interaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin with proteinases. *Biochem J* **133**: 709-724.

**Ben Nasr, A., Herwald, H., Müller-Esterl, W., and Björck, L.** (1995) Human kininogens interact with M protein, a bacterial surface protein and virulence determinant. *Biochem J* **305**: 173-180.

**Berge A., Kihlberg, B.-M., Sjöholm, A.G., and Björck, L.** (1997) Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *J Biol Chem* **272**: 20774-20781.

**Berge, A., and Sjöbring, U.** (1993) PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **268**: 25417-25424.

**Betschel, S.D., Borgia, S.M., Barg, N.L., Low, D.E., and De Azavedo, J.C.S.** (1998) Reduced virulence of group A streptococcal Tn916 mutants that do not produce streptolysin S. *Infect Immun* **66**: 1671-1679.

- Bhattacharjee, G., Asplin, I.R., Wu, S.M., Gawdi, G., and Pizzo, S.V.** (2000) The conformation-dependent interaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin with vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **275**: 26806-26811.
- Bisno, A.L.** (2001) Acute pharyngitis. *N Engl J Med* **344**: 205-211.
- Bisno, A.L.** (1991) Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med* **325**: 783-793.
- Bisno, A.L., and Stevens, D.L.** (1996) Streptococcal infections of skin and soft tissues. *The N Engl J Med* **334**: 240-245.
- Borth, W.** (1994)  $\alpha_2$ -macroglobulin: A multifunctional binding and targeting protein with possible roles in immunity and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* **10**: 267-272.
- Borth, W., and Luger, T.A.** (1989) Identification of  $\alpha_2$ -macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. *J Biol Chem* **264**: 5818-5825.
- Borth, W., and Teodorescu, M.** (1986) Inactivation of human interleukin-2 (IL-2) by  $\alpha_2$ -macroglobulin-trypsin complexes. *Immunol* **57**: 367-371.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandt, E.R., Teh, T., Relf, W.A., Hobb, R.I., and Good, M.F.** (2000) Protective and nonprotective epitopes from amino termini of M proteins from Australian aboriginal isolates and reference strains of group A streptococci. *Infect Immun* **68**: 6587-6594.
- Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J., and Pulverer, G.** (1994) Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. *Gustav Fischer Verlag* 7. Aufl.
- Broder, C.C., Lottenberg, R., von Merring, G.O., Johnston, K.H., and Boyle, M.D.P.** (1991) Isolation of a prokaryotic plasmin receptor. *J Biol Chem* **266**: 4922-4926.

**Broudy, T.B., Pancholi, V., and Fischetti, V.A.** (2002) The in vitro interaction of *Streptococcus pyogenes* with human pharyngeal cells induces a phage-encoded extracellular DNase. *Infect Immun* **70**: 2805-2811.

**Brown, J.H.** (1919) The use of blood agar for the study of streptococci. *New York, The Rockefeller Institute for Medical Research, Monograph No 9*: 122.

**Burns Jr, E.H., Marciel, A.-M., and Musser, J.M.** (1996) Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect Immun* **64**: 4744-4750.

**Chaussee, M.S., Sylva, G.L., Sturdevant, D.E., Smoot, L.M., Graham, M.R., Watson, R.O., and Musser, J.M.** (2002) Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **70**: 762-770.

**Chen, C., and Cleary, P.P.** (1990) Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **265**: 3161-3167.

**Chhatwal, G.S., Müller, H.P., and Blobel, H.** (1983) Characterization of binding of human  $\alpha_2$ -macroglobulin to group G streptococci. *Infect Immun* **41**: 959-964.

**Chhatwal, G.S., Albohn, G., and Blobel, H.** (1987) Novel complex formed between a nonproteolytic cell wall protein of group A streptococci and  $\alpha_2$ -macroglobulin. *J Bacteriol* **169**: 3691-3695.

**Christner, R., Li, Z., Raeder, R., Podbielski, A., and Boyle, M.D.P.** (1997) Identification of the key gene products required for acquisition of plasmin-like enzymatic activity by group A streptococci. *J Infect Dis* **175**: 1115-1120.

**Cleary, P.P., Prahbu, U., Dale, J.B., Wexler, D.E., and Handley, J.** (1992) Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infect Immun* **60**: 5219-5223.

**Coan, M.H., and Roberts, R.C.** (1989) A redetermination of the concentration of  $\alpha_2$ -macroglobulin in human plasma. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **370**: 673-676.

- Coleman, J.L., Sellati, T.J., Testa, J.E., Kew, R.R., Furie, M.B., and Benach, J.L.** (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun* **63**: 2478-2484.
- Collin, M., and Olsén, A.** (2003) Extracellular enzymes with immunomodulating activities: Variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **71**: 2983-2992.
- Collin, M., Svensson, M.D., Sjöholm, A.G., Jensenius, J.C., Sjöbring, U., and Olsén, A.** (2002) EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis. *Infect Immun* **70**: 6646-6651.
- Collin, M., and Olsén, A.** (2001) Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect Immun* **69**: 7187-7189.
- Collin, M., and Olsén, A.** (2000) Generation of a mature streptococcal cysteine proteinase is dependent on cell wall-anchored M1 protein. *Mol Microbiol* **36**: 1306-1318.
- Courtney, H.S., Li, Y., Dale, J.B., and Hasty, D.L.** (1994) Cloning, sequencing and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A Streptococci. *Infect Immun* **62**: 3937-3946.
- Courtney, H.S., Hasty, D.L., and Dale, J.B.** (2003) Serum Opacity Factor (SOF) of *Streptococcus pyogenes* evokes antibodies that opsonize homologous and heterologous SOF-positive serotypes of group A streptococci. *Infect Immun* **71**: 5097-5103.
- Cunningham, M.W.** (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**: 470-511.
- Cunningham, M.W., Antone, S.M., Smart, M., Liu, R., and Kusanke, S.** (1997) Molecular analysis of human cardiac myosin-cross-reactive B- and T-cell epitopes of the group A streptococcal M5 protein. *Infect Immun* **65**: 3913-3923.
- Dale, J.B., and Beachey, E.H.** (1985) Epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac myosin. *J Exp Med* **162**: 583-591.

**Davies, H.D., McGeer, A., Schwartz, B., Green, K., Cann, D., Simor, A.E., Low, D.E., and The Ontario Group A Streptococcal Study Group** (1996) Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. *N Engl J Med* **335**: 547-554.

**D'Costa, S.S., and Boyle, M.D.P.** (1998) Interaction of a group A streptococcus within human plasma results in assembly of a surface plasminogen activator that contributes to occupancy of surface plasmin-binding structures. *Microb Pathog* **24**: 341-349.

**Debane, M.T., Bell, R., and Dolovich, J.** (1976) Characteristics of the macrophage uptake of proteinase-alpha-macroglobulin complexes. *Biochim Biophys Acta* **428**: 466-475.

**Debane, M.T., Bell, R., and Dolovich, J.** (1975) Uptake of proteinase-alpha-macroglobulin complexes by macrophages. *Biochim Biophys Acta* **411**: 295-304.

**Demers, B., Simor, A.E., Vellend, H., Schlievert, P.M., Byrne, S., Jamieson, F., et al.** (1993) Severe invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. *Clin Infect Dis* **16**: 792-800.

**Eberhard, T., Kronvall, G., and Ullberg, M.** (1999) Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog* **26**: 175-181.

**Elliot, S.D.** (1945) A proteolytic enzyme produced by group A streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen. *J Exp Med* **81**: 573-592.

**Erlich, H.A., Gelfand, D.H., and Sakai, R.K.** (1988) Specific DNA amplification. *Nature* **331**: 461-462.

**Facklam, R.F., Martin, D.R., Lovgren, M., Johnson, D.R., Efstratiou, A., Thompson, T.A., Gowan, S., Kriz, P., Tyrrell, G.J., Kaplan, E., and Beall, B.** (2002) Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm 103* to *emm 124*. *Clin Infect Dis* **34**: 28-38.



**Feldman, S.R., Gonias, S.L., and Pizzo, S.V.** (1985) Model of  $\alpha_2$ -macroglobulin structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5700-5704.

**Feldman, S.R., Rosenberg, M.R., Ney, K.A., Michalopoulos, G., and Pizzo, S.V.** (1985) Binding of alpha 2-macroglobulin to hepatocytes: mechanism of in vivo clearance. *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 795-802.

**Fernie-King, B.A., Seilly, D.J., Willers, C., Wurzner, R., Davies, A., and Lachmann, P.J.** (2001) Streptococcal inhibitor of complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C5b-9 on to cell membranes. *Immunol* **103**: 390-398.

**Fischetti, V.A.** (1989) Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* **2**: 285-314.

**Fischetti, V.A., Jones, K.F., Hollingshead, S.K., and Scott, J.R.** (1988) Structure, function, and genetics of streptococcal M protein. *Rev Infect Dis* **10**: 356-359.

**Frick, I.M., Akesson, P., Rasmussen, M., Schmidtchen, A., and Bjorck, L.** (2003) SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem* **278**: 16561-16566.

**Garber, T.R., Gonias, S.L., and Webb, D.J.** (2000) Interleukin-4 and IL-10 bind covalently to activated human  $\alpha_2$ -macroglobulin by a mechanism that requires Cys<sup>949</sup>. *J Interf Cytok Res* **20**: 125-131.

**Gill, S.C., and von Hippel, P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326.

**Goldmann, O., Chhatwal, G.S., and Medina, E.** (2003) Immune mechanisms underlying host susceptibility to infection with group A streptococci. *J Infect Dis* **187**: 845-861.

**Goldsby, R.A., Kindt, T.J., and Osborne, B.A.** (2000) Kuby Immunology, 4th ed.. W.H. Freeman And Company, New York.

- Gonias, S.L., Carmichael, A., Mettenburg, J.M., Roadcap, D.W., Irvin, W.P., and Webb, D.J.** (2000) Identical or overlapping sequences in the primary structure of human  $\alpha_2$ -macroglobulin are responsible for the binding of nerve growth factor- $\beta$ , platelet-derived growth factor-BB, and transforming growth factor- $\beta^*$ . *J Biol Chem* **275**: 5826-5831.
- Graham, M.R., Smoot, L.M., Lux Migliaccio, C.A., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Federle, M.J., Adams, G.J., Scott, J.R., and Musser, J.M.** (2002) Virulence control in group A Streptococcus by a two-component gene regulatory system: Global expression profiling and in vivo infection modeling. *PNAS* **99**: 13855-13860.
- Guilherme, L., Cunha-Neto, E., Coelho, V., Snitcowsky, R., Pomerantzeff, P.M., Assis, R.V., Pedra, F., Neumann, J., Goldberg, A., Patarroyo, M.E., *et al.*** (1995) Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* **92**: 415-420.
- Gültekin, H., and Heermann, K.H.** (1988) The use of polyvinylidenedifluorid membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* **172**: 320-329.
- Hasty, T.L., Ofek, I., Courtney, H.S., and Doyle, R.J.** (1992) Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* **60**: 2147-2152.
- Herwald, H., Collin, M., Müller-Esterl, W., and Björck, L.** (1996) Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: A novel virulence mechanism. *J Exp Med* **184**: 665-673.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.K.** (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**: 7351-7367.
- Horn, D.L., Zabriskie, J.B., Austrian, R., Cleary, P.P., Ferretti, J.J., Fischetti, V.A., Gotschlich, E., Kaplan, E.L., McCarty, M., Opal, S.M., Roberts, R.B., Tomasz, A., and Wachtfogel, Y.** (1998) Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin Infect Dis* **26**:1341-1345.

- Horstmann, R.D., Sievertsen, H.J., Knobloch, J., and Fischetti, V.A.** (1988) Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1657-1661.
- Horstmann, R.D., Sievertsen, H.J., Leippe, M., and Fischetti, V.A.** (1992) Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M protein. *Infect Immun* **60**: 5036-5041.
- Howell, J.B., Beck, T., Bates, B., and Hunter, M.J.** (1983) Interaction of alpha 2-macroglobulin with trypsin, chymotrypsin, plasmin, and papain. *Arch Biochem Biophys* **221**: 261-270.
- Hussain, M.M., Strickland, D.K., and Bakillah, A.** (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr* **19**: 141-172.
- Hynes, W.L., Hancock, L., and Ferretti, J.J.** (1995) Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: Evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun* **63**: 3015-3020.
- Imber, M.J., and Pizzo, S.V.** (1981) Clearance and binding of two electrophoretic "fast" forms of human alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* **256**: 8134-8139.
- Ishizaka, S., Kuriyama, S., and Tsujii, T.** (1989) In vivo depletion of macrophages by desulfated iota-carrageenan in mice. *J Immunol Methods* **124**: 17-24.
- Janulczyk, R., and Rasmussen, M.** (2001) Improved pattern for genome-based screening identifies novel cell wall-attached proteins in gram-positive bacteria. *Infect Immun* **69**: 4010-4026.
- Ji, Y., Carlson, B., Kondagunta, A., and Cleary, P.P.** (1997) Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **65**: 2080-2087.

- Johnson, D.R., Wotton, J.T., Shet, A., and Kaplan, E.L.** (2002) A comparison of group A streptococci from invasive and uncomplicated infections: Are virulent clones responsible for serious streptococcal infections? *J Infect Dis* **185**: 1586-1595.
- Johnsson, E., Berggård, K., Kotarsky, H., Hellwage, J., Zipfel, P.F., Sjöbring, U., and Lindahl, G.** (1998) Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins. Binding of a human complement inhibitor. *J Immunol* **161**: 4894-4901.
- Jonsson, H., Burtsoff-Asp, C., and Guss, B.** (1995) Streptococcal protein MAG – a protein with broad albumin binding specificity. *Biochim Biophys Acta* **1249**: 65-71.
- Jonsson, H., Lindmark, H., and Guss, B.** (1995) A protein G-related cell surface protein in *Streptococcus zooepidemicus*. *Infect Immun* **63**: 2968-2975.
- Jonsson, H., Frykberg, L., Rantamäki, L., and Guss, B.** (1994) MAG, a novel protein receptor from *Streptococcus dysgalactiae*. *Gene* **143**: 85-89.
- Jonsson, H., and Müller, H.P.** (1994) The type-III Fc receptor from *Streptococcus dysgalactiae* is also an  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor. *Europ J Biochem* **220**: 819-826.
- Justus, C.W.E., Müller, H.P., Simon, M.M., and Kramer, M.D.** (1990) Quantification of free  $\alpha_2$ -macroglobulin and  $\alpha_2$ -macroglobulin-protease complexes by a novel ELISA system based on streptococcal  $\alpha_2$ -macroglobulin receptors. *J Immunol Meth* **126**:103-108.
- Kaplan, E.L.** (1991) The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**: 55-57.
- Kapur, V., Maffei, J.T., Greer, R.S., Li, L.L., Adams, G.J., and Musser, J.M.** (1994) Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. *Microb Pathog* **16**: 443-450.

**Kapur, V., Topouzis, S., Majesky, M.W., Li, L.-L., Hamrick, M.R., Hamill, R.J., et al.** (1993) A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb Pathog* **15**: 327-346.

**Kapur, V., Majesky, M.W., Li, L.-L., Black, R.A., and Musser, J.M.** (1993) Cleavage of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) precursor to produce active IL-1 $\beta$  by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7676-7680.

**Kaul, R., McGeer, A., Norrby-Teglund, A., Kotb, M., Schwartz, B., O'Rourke, K., Talbot, J., and Low, D.E.** (1999) Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome – a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* **28**: 800-807.

**Kaul, R., McGeer, A., Low, D.E., Green, K., Schwartz, B., and Simor, A.E.** (1997) Population-based surveillance for group A streptococcal necrotizing fasciitis: Clinical features, prognostic indicators, and microbiologic analysis of seventy-seven cases. *Am J Med* **103**: 18-24.

**Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., and Zinkernagel, R.M.** (1998) Medizinische Mikrobiologie. *Thieme Verlag* 9. Aufl.

**Kotb, M., Norrby-Teglund, A., McGeer, A., El-Sherbini, H., Dorak, M.T., Khurshid, A., Green, K., Peeples, J., Wade, J., Thomson, G., Schwartz, B., and Low, D.E.** (2002) An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nature Med* **8**: 1398-1404.

**Krause, R.M.** (2002) A half-century of streptococcal research: Then & now. *Indian J Med Res* **115**: 215-241.

**Krieger, M., and Herz, J.** (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **63**: 601-637.

**Lähteenmäki, K., Virkola, R., Pouttu, R., Kuusela, P., Kukkonen, M., and Korhonen, T.K.** (1995) Bacterial plasminogen receptors: *In vitro* evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun* **63**: 3659-3664.

**Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

**Lancefield, R.C.** (1962) Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* **89**: 307-313.

**Lancefield, R.C.** (1957) Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special references to the bactericidal test. *J Exp Med* **107**: 525-544.

**Lancefield, R.C.** (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* **57**: 571-595.

**Lancefield, R.C.** (1928) The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. II. Chemical and immunological properties of the protein fractions. *J Exp Med* **47**: 469-480.

**Lancefield, R.C.** (1928) The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. III. Chemical and immunological properties of the species-specific substances. *J Exp Med* **47**: 481-491.

**Li, Z., Ploplis, V.A., French, E.L., and Boyle, M.D.P.** (1999) Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. *J Infect Dis* **179**: 907-914.

**Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., and Boyle, M.D.P.** (1994) Capturing host plasmin(ogen): A common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* **2**: 20-24.

**Lottenberg, R., Broder, C.C., Boyle, M.D.P., Kain, S.J., Schroeder, B.L., and Curtiss, R., III.** (1992) Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol* **174**: 5204-5210.

- Lukomski, S., Hoe, N.P., Abdi, I., Rurangirwa, J., Kordari, P., Liu, M., et al.** (2000) Nonpolar inactivation of the hypervariable streptococcal inhibitor of complement gene (*sic*) in serotype M1 *Streptococcus pyogenes* significantly decreases mouse mucosal colonization. *Infect Immun* **68**: 535-542.
- Machling, R.C.** (1969) An inexpensive and reliable method of negative-pressure paraffin wax embedding. *J Med Lab Technol* **26**: 271.
- Manjula, B.N., Trus, B.L., and Fischetti, V.A.** (1985) Presence of two distinct regions in the coiled-coil structure of the streptococcal Pep M5 protein: relationship to mammalian coiled-coil proteins and implications to its biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1064-1068.
- Matsuda, T., Hirano, T., Nagasawa, S., and Kishimoto, T.** (1989) Identification of  $\alpha_2$ -macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J Immunol* **142**: 0148-0152.
- McCormick, J.K., Tripp, T.J., Olmsted, S.B., Matsuka, Y.V., Gahr, P.J., Ohlendorf, D.H., and Schlievert, P.M.** (2000) Development of streptococcal pyrogenic exotoxins C vaccine toxoids that are protective in the rabbit model of toxic shock syndrome. *J Immunol* **165**: 2306-2312.
- Medina, E., Goldmann, O., Rohde, M., Lengeling, A., and Chhatwal, G.S.** (2001) Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J Infect Dis* **184**: 846-852.
- Medina, E., Talay, S.R., Chhatwal, G.S., and Guzmán, C.A.** (1998) Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* promotes T cell-independent proliferation of murine B lymphocytes and enhances the expression of MHC class II molecules on antigen-presenting cells. *Int Immunol* **10**: 1657-1664.
- Mettenburg, J.M., Webbs, D.J., and Gonias, S.L.** (2002) Distinct binding sites in the structure of  $\alpha_2$ -macroglobulin mediate the interaction with  $\beta$ -amyloid peptide and growth factors. *J Biol Chem* **277**: 13338-13345.

- Molinari, G., Talay, S.R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., and Chhatwal, G.S. (1997)** The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* **65**: 1357-1363.
- Moncino, M., Roche, P.A., and Pizzo, S.V. (1991)** Characterization of human  $\alpha_2$ -macroglobulin monomers obtained by reduction with dithiothreitol. *Biochem* **30**: 1545-1551.
- Müller, H.P., and Rantamäki, L.K. (1995)** Binding of native  $\alpha_2$ -macroglobulin to human group G streptococci. *Infect Immun* **63**: 2833-2839.
- Musser, J.M., Kapur, V., Szeto, J., Pan, X., Swanson, D.S., and Martin, D.S. (1995)** Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: Recent intercontinental spread of a subclone causing episodes of invasive disease. *Infect Immun* **63**: 994-1003.
- Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999)** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 174-229.
- Norrby-Teglund, A., Ihendyane, N., Kansal, R., Basma, H., Kotb, M., Andersson, J., and Hammarstrom, L. (2000)** Relative neutralizing activity in polyspecific IgM, IgA and IgG preparations against group A streptococcal superantigens. *Clin Infect Dis* **31**: 1175-1182.
- Novak, R. (1994)** Flesh-eating bacteria: not new, but still worrisome. *Science* **264**: 1655.
- Okada, N., Liszewski, M., Atkinson, J., and Caparon, M. (1995)** Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2489-2493.
- Okada, N., Pentland, A.P., Falk, P., and Caparon, M.G. (1994)** M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissues. *J Clin Invest* **94**: 965-977.
- Pancholi, V., and Fischetti, V.A. (1998)**  $\alpha$ -enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* **273**: 14503-14515.



**Pancholi, V., and Fischetti, V.A.** (1997) A novel plasminogen/plasmin binding protein on the surface of group A streptococci. *Adv Exp Med Biol* **418**: 597-599.

**Pancholi, V., and Fischetti, V.A.** (1993) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8154-8158.

**Petersen, C.M., Ejlersen, E., Moestrup, S.K., Jensen, P.H., Sand, O., and Sottrup-Jensen, L.** (1989) Immunosuppressive properties of electrophoretically „slow“ and „fast“ form  $\alpha_2$ -macroglobulin: Effects on cell-mediated cytotoxicity and (allo-) antigen-induced T cell proliferation. *J Immunol* **142**: 629-635.

**Potter, H.** (1988) Electroporation in biology: methods applications and instrumentation. *Anal Biochem* **174**: 361-373.

**Pruksakorn, S., Currie, B., Brandt, E., Phornphutkul, C., Hunsakunachai, S., Manmontri, A., Robinson, J.H., Kehoe, M.A., Galbraith, A., and Good, M.F.** (1994) Identification of T cell autoepitopes that cross-react with the C-terminal segment of the M-protein of group A streptococci. *Int Immunol* **6**: 1235-1244.

**Rasmussen, M., and Björck, L.** (2002) Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **43**: 537-544.

**Rasmussen, M., Müller, H.P., and Björck, L.** (1999) Protein GRAB of *Streptococcus pyogenes* regulates proteolysis at the bacterial surface by binding  $\alpha_2$ -macroglobulin. *J Biol Chem* **274**:15336-15344.

**Rhem, H., and Lazdunski, M.** (1992) Purification, affinity labeling and reconstitution of voltage-sensitive potassium channels. *Methods Enzymol* **207**: 556-564.

**Robert, C., and Kupper, T.S.** (1999) Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* **341**: 1817-1828.

**Sambrook, J., Fritsch, E.J., and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 2<sup>nd</sup> edition.

**Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

**Saouda, M., Wu, W., Conran, P., and Boyle, M.D.P.** (2001) Streptococcal pyrogenic exotoxin B enhances tissue damage initiated by other *Streptococcus pyogenes* products. *J Infect Dis* **184**: 723-731.

**Schmidt, K.H., and Wadstrom, T.** (1990) A secreted receptor related to M1 Protein of *Streptococcus pyogenes* binds to fibrinogen, IgG, and albumin. *Int J Med Microbiol* **273**: 216-228.

**Schmidtchen, A., Frick, I.-M., and Bjorck, L.** (2001) Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial  $\alpha$ -defensins. *Mol Microbiol* **39**: 708-713.

**Schrager, H.M., Alberti, S., Cywes, C., Dougherty, G.J., and Wessels, M.R.** (1998) Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A streptococcus to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest* **101**: 1708-1716.

**Schulze, K., Medina, E., Chhatwal, G.S., and Guzmán, C.A.** (2003) Stimulation of long-lasting protection against *Streptococcus pyogenes* after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. *Vaccine* **21**: 1967-1973.

**Sjöbring, U., Bjorck, L., and Kastern, W.** (1991) Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties. *J Biol Chem* **266**: 399-405.

**Sjöbring, U., Trojnar, J., Grubb, A., Åkerström, B., and Björck, L.** (1989) Ig-binding bacterial proteins also bind proteinase inhibitors. *J Immunol* **143**: 2948-2954.

**Smith, J.A.** (1994) Neutrophils, host defence, and inflammation: A double edged sword. *J Leukoc Biol* **56**: 672-686.

**Song, X.M., Perez-Casal, J., Bolton, A., and Potter, A.A.** (2001) Surface-expressed Mig protein protects *Streptococcus dysgalactiae* against phagocytosis by bovine neutrophils. *Infect Immun* **69**: 6030-6037.

**Sottrup-Jensen, L.** (1989)  $\alpha$ -Macroglobulins: Structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* **264**: 11539-11542.

**Sottrup-Jensen, L., Lønblad, P.B., Stepanik, T.M., Petersen, T.E., Magnusson, S., and Jörnvall, H.** (1981) Primary structure of the 'bait' region for proteinases in  $\alpha_2$ -macroglobulin: Nature of the complex. *FEBS Letters* **127**: 167-173.

**Sottrup-Jensen, L., Petersen, T.E., and Magnusson, S.** (1981) Mechanism of proteinase complex formation with  $\alpha_2$ -macroglobulin; Three modes of trypsin binding. *FEBS Lett* **128**: 127-132.

**Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T.M., Kristensen, T., Wierzbicki, D.M., Jones, C.M., Lønblad, P.B., Magnusson, S., and Petersen, T.E.** (1984) Primary structure of human  $\alpha_2$ -macroglobulin. *J Biol Chem* **259**: 8318-8327.

**Southern, E.M.** (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol* **68**: 152-176.

**Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

**Sriskandan, S., McKee, A., Hall, L., and Cohen, J.** (1997) Comparative effects of clindamycin and ampicillin on superantigenic activity of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* **40**: 275-277.

**Stevens, D.L.** (2000) Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. *Annu Rev Med* **51**: 271-288.

- Stevens, D.L.** (1999) The flesh-eating bacterium: What's next? *J Infect Dis* **179**: S366-S374.
- Stevens, D.L., Tanner, M.H., Winship, J., Siwerts, R., Ries, K.M., Schlievert, P.M., and Kaplan, E.L.** (1989) Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock like syndrome and scarlet fever toxin. *A N Engl J Med* **321**: 321-327.
- Stevens, D.L.** (1995) Streptococcal toxic-shock syndrome: Spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis* **1**: 69-78.
- Stevens, D.L.** (1992) Invasive group A streptococcus infections. *Clin Infect Dis* **14**: 2-13.
- Straight, D.L., Jakoi, L., McKee, P.A., and Snyderman, R.** (1988) Binding of  $\alpha_2$ -macroglobulin-thrombin complexes and methylamine-treated  $\alpha_2$ -macroglobulin to human blood monocytes. *Biochem* **27**: 2885-2890.
- Svensson, M.D., Scaramuzzino, D.A., Sjöbring, U., Olsén, A., Frank, C., and Bessen, D.E.** (2000) Role for a secreted cysteine proteinase in the establishment of host tissue tropism by group A streptococci. *Mol Microbiol* **38**: 242-253.
- Tewodros, W., Norgren, M., and Kronvall, G.** (1994) Streptokinase activity among group A streptococci in relation to streptokinase genotype, plasminogen binding, and disease manifestations. *Microb Pathogenesis* **18**: 53-65.
- Thern, A., Stenberg, L., Dahlbäck, B., and Lindahl, G.** (1995) Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* **154**: 375-386.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Travis, J., and Salvesen, G.S.** (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* **52**: 655-709.

- Valentin-Weigand, P., Traore, M.Y., Blobel, H., and Chhatwal, G.H.** (1990) Role of  $\alpha_2$ -macroglobulin in phagocytosis of group A and C streptococci. *FEMS Microbiol Letters* **70**: 321-324.
- Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J.C., and Kuiper, J.** (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* **16**: 379-414.
- Vasi, J., Svennsson, J., Frick, I.M., and Müller, H.P.** (1999) Five homologous repeats of the protein G-related protein MIG cooperate in binding to goat immunoglobulin G. *Infect Immun* **67**: 413-416.
- Veasy, L.G., Wiedmeier, S.E., Orsmond, G.S., Ruttenberg, H.D., Boucek, M.M., Roth, S.J., Tait, V.F., Thompson, J.A., Daly, J.A., Kaplan, E.L., et al.** (1987) Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. *N Engl J Med* **316**: 421-427.
- Wang, H., Lottenberg, R., and Boyle, M.D.P.** (1995) A role for fibrinogen in the streptokinase-dependent acquisition of plasmin(ogen) by group A streptococci. *J Infect Dis* **171**: 85-92.
- Wang, H., Lottenberg, R., and Boyle, M.D.P.** (1995) Analysis of the interaction of group A streptococci with fibrinogen, streptokinase and plasminogen. *Microb Pathogenesis* **18**: 153-166.
- Wang, H., Lottenberg, R., and Boyle, M.D.P.** (1994) Analysis of plasmin(ogen) acquisition by clinical isolates of group A streptococci incubated in human plasma. *J Infect Dis* **169**: 143-149.
- Wannamaker, L.W.,** (1958) The differentiation of three distinct desoxyribonucleases of group A streptococci. *J Exp Med* **107**: 797-812.
- Weiss, S.J.** (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**: 365-376.

**Wexler, D.E., Chenoweth, D.E., and Cleary, P.P.** (1985) Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8144-8148.

**Williams, S.E., Ashcom, J.D., Argraves, W.S., and Strickland, D.K.** (1992) A novel mechanism for controlling the activity of  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem* **267**: 9035-9040.

**Williams, S.E., Kounnas, M.Z., Argraves, K.M. Argraves, W.S., and Strickland, D.K.** (1994) The  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and the receptor-associated protein. An overview. *Ann N Y Acad Sci* **737**: 1-13.

**Winram, S.B., and Lottenberg, R.** (1998) Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) indentifies the C-terminal Lys<sup>334</sup> as essential for plasmin binding, but mutation of the *plr* gene does not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiology* **144**: 2025-2035.

**Zimbelman, J., Palmer, A., and Todd, J.** (1999) Improved outcome of clindamycin compared with beta-lactam antibiotic treatment for invasive *Streptococcus pyogenes* infection. *Pediatr Infect Dis J* **18**: 1096-1100.

## VII. Anhang

### 1. Übersicht der klinischen GAS Isolate

**Tab. 17:** Liste der hinsichtlich ihrer  $\alpha_2$ -M Bindung getesteten GAS Isolate.

GBF #	Stamm	VT	T	emm-ST	M-Typ/	Isoliert aus	Herkunft	$\alpha_2$ -M Bindung	grab-Gen (~bp)
A2	27348	91	1	-	M1	Rachen	Deutschland	14 %	650
A4	416	3,1	8	-	-	Rachen	Deutschland	14 %	650
A5	45984	92	B3284	-	-	Rachen	Deutschland	5 %	700
A6	48226	88	-	-	M3	Rachen	Deutschland	32 %	900
A7	49319	40	5/27/44	-	-	Rachen	Deutschland	4 %	800
A8	49332	40	5/27/44	-	-	Rachen	Deutschland	11 %	800
A9	58504	-	4	-	M60	Rachen	Deutschland	1 %	pos.
A10	6	-	1	-	M1	Rachen	Deutschland	3 %	650
A11	7055	1	22	-	-	Rachen	Deutschland	2 %	900
A12	71-194	1	4	-	M4	Rachen	Deutschland	1 %	900
A13	71-709	93	4	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	650
A15	71-715	17,1	4	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	pos.
A18	75401	-	25	-	-	Rachen	Deutschland	4 %	pos.
A26	BS 01	1	11	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	pos.
A27	BS 02	27	2	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	pos.
A28	BS 04	-	12	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	500
A30	BS 07	1	11	-	-	Rachen	Deutschland	0 %	pos.
A31	BS 08	1	11	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	pos.
A37	BS 17	-	B3284	-	-	Rachen	Deutschland	3 %	800
A38	BS 18	-	12	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	500
A40	BS 20	-	12	-	-	Rachen	Deutschland	5 %	600
A41	BS 21	-	12	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	600
A42	BS 22	-	4	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	600
A48	BS 28	-	12	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	600
A50	BS 30	-	28	-	-	Rachen	Deutschland	8 %	800
A51	BS 31	-	12	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	600
A116	1	88	-	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	1031
A117	2	-	-	-	-	Rachen	Deutschland	3 %	900
A118	3	-	-	-	-	Rachen	Deutschland	3 %	800
A119	16836	88	-	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	-
A121	17007	-	-	-	-	Rachen	Deutschland	5 %	800
A122	17374	88	-	-	-	Rachen	Deutschland	2 %	1031
A124	17827	67	-	-	-	Rachen	Deutschland	1 %	-
A169	NS 678	33,2	-	-	-	Rachen	Australien	6 %	-
A185	NS 704	33,2	-	-	-	Rachen	Australien	7 %	700
A216	CK 470	29,4	-	d633	-	Rachen	Australien	4 %	600
A223	T 155	17,6	-	-	-	Rachen	Australien	3 %	-
A231	NS 880	52	-	12	-	Rachen	Australien	3 %	-
A234	NS 488	52	-	12	-	Rachen	Australien	3 %	-
A250	NS696	78	-	1	-	Rachen	Australien	7 %	-
A146	NS 14	96	-	-	-	Haut (Wunde)	Australien	2 %	-
A148	NS 260	78	-	1	-	Haut (Wunde)	Australien	15 %	-
A149	NS 424	61	-	14	-	Haut (Abszess)	Australien	9 %	-
A153	BSB 19	6	-	-	-	Haut (C)	Australien	26 %	-
A154	DRY 6	12,2	-	-	-	Haut (C)	Australien	21 %	-
A155	BL 24	15	-	-	-	Haut (C)	Australien	17 %	-
A157	NS 1042	77	-	ck401	-	Haut (Wunde)	Australien	3 %	-
A158	NS 342	82	-	-	-	Haut (Lesion)	Australien	71 %	1200
A171	NS 297	3,1	-	-	M44/61	Haut (Entzündung)	Australien	2 %	-
A172	NS 294	60	-	74	-	Haut (Wunde)	Australien	12 %	-
A175	DRY 5	37	-	ns544	-	Haut (C)	Australien	2 %	-
A177	BSA 29	5	-	-	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A181	NS 231	76	-	-	-	Haut (Hand)	Australien	4 %	1031
A184	NS 539	1	-	-	-	Haut (Wunde)	Australien	2 %	-
A186	NS 822	2,2	-	pt4931	-	Haut (Wunde)	Australien	3 %	-
A188	BL 16	25	-	pt2612	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A190	DRY 3	19	-	74	-	Haut (C)	Australien	43 %	1200

A191	DRX 5	30	-	-	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A193	BSA 39	7,1	-	-	M63	Haut (C)	Australien	3 %	-
A194	NS 300	29,2	-	d633	-	Haut (Entzündung)	Australien	8 %	600
A195	NS 343	29,2	-	d633	-	Haut (Wunde)	Australien	<b>40 %</b>	1200
A196	NS 415	71	-	-	M63	Haut (Wunde)	Australien	3 %	-
A198	NS 727	3,6	-	-	-	Haut (Wunde)	Australien	3 %	-
A208	NS 683	35	-	-	-	Haut (Wunde)	Australien	4 %	-
A209	NS 835	83	-	-	-	Haut (Wunde)	Australien	2 %	-
A213	CK 97	17,5	-	70	-	Haut (C)	Australien	<b>22 %</b>	-
A214	CK 285	81	-	14	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A215	CK 309	32	-	81	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A217	CK 520	17,3	-	88/31	-	Haut (C)	Australien	<b>11 %</b>	-
A218	SO 39	27,2	-	-	-	Haut (Samoan)	Australien	<b>19 %</b>	-
A219	SO 41	66	-	-	-	Haut (Samoan)	Australien	3 %	-
A220	SO 25A	29,3	-	-	-	Haut (Samoan)	Australien	<b>31 %</b>	-
A221	SO 44B	50	-	-	-	Haut (Samoan)	Australien	5 %	-
A222	DRZ 2	20,1	-	ns1	-	Haut (C)	Australien	<b>15 %</b>	-
A225	NS 483	61	-	14	-	Haut (Milben)	Australien	2 %	900
A229	NS 989	2,2	-	58	-	Haut (Wunde)	Australien	3 %	-
A236	NS 701	41	-	-	-	Haut (Wunde)	Australien	8 %	850
A237	NS 813	33,2	-	-	-	Haut (Urethra)	Australien	4 %	-
A240	SO 64A	12,2	-	-	-	Haut (Samoan)	Australien	7 %	-
A241	# 273	39	-	80	-	Haut (C)	Australien	<b>23 %</b>	-
A243	BSA 16	8	-	57	-	Haut (C)	Australien	<b>13 %</b>	-
A251	NS 693	57	-	69	-	Haut (Abszess)	Australien	3 %	-
A252	DRV 1	18	-	55	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A254	# 258	43	-	-	-	Haut (C)	Australien	3 %	-
A257	NS 266	49	-	-	-	Haut (Infektion)	Australien	<b>20 %</b>	-
A258	NS 288	29,1	-	52	-	Haut (Geschwür)	Australien	5 %	600

Alle aufgeführten Stämme stammen von Patienten mit nicht invasiven Infektionen. Der Nachweis des *grb*-Gens wurde, aufgrund der vorhergehenden positiven Testung von 126 GAS Isolaten, nur bei einem Teil der hier aufgeführten Stämme durchgeführt.

(GBF#: Fortlaufende Labornummer der *S. pyogenes* Isolate, Stamm: Originalbezeichnung, VT: Vir Typ, T: T-Typ, *emm*-ST: Sub Typ, C: Community [Ureinwohnergemeinde])



## 2. Peptidsequenzen, densitometrische Analyse

Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 10
1	VDSPIEQPRIIPNGG
2	DSPIEQPRIIPNGGT
3	SPIEQPRIIPNGGTL
4	PIEQPRIIPNGGTLT
5	IEQPRIIPNGGTLTN
6	EQPRIIPNGGTLTNL
7	QPRIIPNGGTLTNLL
8	PRIIPNGGTLTNLLG
9	RIIPNGGTLTNLLGN
10	IIPNGGTLTNLLGNA
11	IPNGGTLTNLLGNAP
12	PNGGTLTNLLGNAPE
13	NGGTLTNLLGNAPEK
14	GTLTNLLGNAPEKL
15	GTLTNLLGNAPEKLA
16	TLTNLLGNAPEKLAL
17	LTNLLGNAPEKLALR
18	TNLLGNAPEKLALRN
19	NLLGNAPEKLALRNE
20	LLGNAPEKLALRNEE
21	LGNAPEKLALRNEER
22	GNAPEKLALRNEERA
23	NAPEKLALRNEERAI
24	APEKLALRNEERAID
25	PEKLALRNEERAIDE
26	EKLALRNEERAIDEL
27	KLALRNEERAIDELK
28	LALRNEERAIDELKK
29	ALRNEERAIDELKKQ
30	LRNEERAIDELKKQA
31	RNEERAIDELKKQAI
32	NEERAIDELKKQAIE
33	EERAIDELKKQAIED
34	ERAIDELKKQAIEDK
35	RAIDELKKQAIEDKE
36	AIDELKKQAIEDKEA
37	IDELKKQAIEDKEAT
38	DELKKQAIEDKEATT
39	ELKKQAIEDKEATTA
40	LKKQAIEDKEATTAI
41	KKQAIEDKEATTAIE
42	KQAIEDKEATTAIEA
43	QAIEDKEATTAIEAA
44	AIEDKEATTAIEAAS

Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 11B
1	IIPNGGTL
2	IPNGGTLT
3	PNGGTLTN
4	NGGTLTNL
5	GGTLTNLL
6	RIIPNGGTL
7	IIPNGGTLT
8	IPNGGTLTN
9	PNGGTLTNL
10	NGGTLTNLL
11	GGTLTNLLG
12	PRIIPNGGTL
13	RIIPNGGTLT
14	IIPNGGTLTN
15	IPNGGTLTNL
16	PNGGTLTNLL
17	NGGTLTNLLG
18	GGTLTNLLGN
19	QPRIIPNGGTL
20	PRIIPNGGTLT
21	RIIPNGGTLTN
22	IIPNGGTLTNL
23	IPNGGTLTNLL
24	PNGGTLTNLLG
25	NGGTLTNLLGN
26	GGTLTNLLGNA
27	EQPRIIPNGGTL
28	QPRIIPNGGTLT
29	PRIIPNGGTLTN
30	RIIPNGGTLTNL
31	IIPNGGTLTNLL
32	IPNGGTLTNLLG
33	PNGGTLTNLLGN
34	NGGTLTNLLGNA
35	GGTLTNLLGNAP
36	IEQPRIIPNGGTL
37	EQPRIIPNGGTLT
38	QPRIIPNGGTLTN
39	PRIIPNGGTLTNL
40	RIIPNGGTLTNLL
41	IIPNGGTLTNLLG
42	IPNGGTLTNLLGN
43	PNGGTLTNLLGNA
44	NGGTLTNLLGNAP
45	GGTLTNLLGNAPE
46	PIEQPRIIPNGGTL
47	IEQPRIIPNGGTLT
48	EQPRIIPNGGTLTN
49	QPRIIPNGGTLTNL
50	PRIIPNGGTLTNLL
51	RIIPNGGTLTNLLG
52	IIPNGGTLTNLLGN
53	IPNGGTLTNLLGNA
54	PNGGTLTNLLGNAP
55	NGGTLTNLLGNAPE
56	GGTLTNLLGNAPEK
57	PIEQPRIIPNGGTL
58	IEQPRIIPNGGTLT
59	EQPRIIPNGGTLTN
60	QPRIIPNGGTLTNL
61	PRIIPNGGTLTNLL
62	RIIPNGGTLTNLLG
63	IIPNGGTLTNLLGN
64	IPNGGTLTNLLGNA
65	PNGGTLTNLLGNAP
66	NGGTLTNLLGNAPE
67	GGTLTNLLGNAPEK
68	GTLTNLLGNAPEKL

Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 11E
1	TNLLGNAPE
2	NLLGNAPEK
3	LLGNAPEKL
4	LGNAPKLA
5	GNAPEKLAL
6	NAPEKLALR
7	LTNLLGNAPE
8	TNLLGNAPEK
9	NLLGNAPEKL
10	LLGNAPEKLA
11	LGNAPKLA
12	GNAPEKLALR
13	NAPEKLALRN
14	TLTNLLGNAPE
15	LTNLLGNAPEK
16	TNLLGNAPEKL
17	NLLGNAPEKLA
18	LLGNAPEKLAL
19	LGNAPKLA
20	GNAPEKLALRN
21	NAPEKLALRNE
22	GTLTNLLGNAPE
23	TLTNLLGNAPEK
24	LTNLLGNAPEKL
25	TNLLGNAPEKLA
26	NLLGNAPEKLAL
27	LLGNAPEKLALR
28	LGNAPKLA
29	GNAPEKLALRNE
30	NAPEKLALRNEE
31	GGTLTNLLGNAPE
32	GTLTNLLGNAPEK
33	TLTNLLGNAPEKL
34	LTNLLGNAPEKLA
35	TNLLGNAPEKLAL
36	NLLGNAPEKLALR
37	LLGNAPEKLALRN
38	LGNAPKLA
39	GNAPEKLALRNEE
40	NAPEKLALRNEER
41	NGGTLTNLLGNAPE
42	GGTLTNLLGNAPEK
43	GTLTNLLGNAPEKL
44	TLTNLLGNAPEKLA
45	LTNLLGNAPEKLAL
46	TNLLGNAPEKLALR
47	NLLGNAPEKLALRN
48	LLGNAPEKLALRNE
49	LGNAPKLA
50	GNAPEKLALRNEER
51	NAPEKLALRNEERA
52	PNGGTLTNLLGNAPE
53	NGGTLTNLLGNAPEK
54	GGTLTNLLGNAPEKL
55	GTLTNLLGNAPEKLA
56	TLTNLLGNAPEKLAL
57	LTNLLGNAPEKLALR
58	TNLLGNAPEKLALRN
59	NLLGNAPEKLALRNE
60	LLGNAPEKLALRNEE
61	LGNAPKLA
62	GNAPEKLALRNEERA
63	NAPEKLALRNEERAI

Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 124	Intensität (%)	Spot Nr.	Spot-Membran Fig. 124	Intensität (%)	Spot Nr.	Spot-Membran Fig. 124	Intensität (%)
1	ARIIPNGGTL	85	71	PRIMPNGGTL	54	141	PRIIPNGATL	54
2	CRIIPNGGTL	55	72	PRINPNGGTL	76	142	PRIIPNGCTL	46
3	DRIIPNGGTL	0	73	PRIPPNGGTL	72	143	PRIIPNGDTL	0
4	ERIIPNGGTL	0	74	PRIQPNGGTL	77	144	PRIIPNGETL	0
5	FRIPNGGTL	62	75	PRIRPNGGTL	67	145	PRIIPNGFTL	55
6	GRIIPNGGTL	74	76	PRISPNGGTL	88	146	PRIIPNGGTL	71
7	HRIIPNGGTL	66	77	PRITPNGGTL	71	147	PRIIPNGHTL	42
8	IRIIPNGGTL	65	78	PRIVPNGGTL	61	148	PRIIPNGITL	53
9	KRIIPNGGTL	63	79	PRIWPNGGTL	59	149	PRIIPNGKTL	76
10	LRIIPNGGTL	53	80	PRIYPNGGTL	68	150	PRIIPNGLTL	51
11	MRIIPNGGTL	46	81	PRIIANGGTL	56	151	PRIIPNGMTL	75
12	NRIIPNGGTL	50	82	PRIICNGGTL	61	152	PRIIPNGNTL	72
13	PRIIPNGGTL	66	83	PRIIDNGGTL	27	153	PRIIPNGPTL	77
14	QRIIPNGGTL	52	84	PRIIENGTL	26	154	PRIIPNGQTL	65
15	RRIIPNGGTL	49	85	PRIIFNGGTL	44	155	PRIIPNGRTL	65
16	SRIIPNGGTL	53	86	PRIIGNGGTL	47	156	PRIIPNGSTL	58
17	TRIIPNGGTL	53	87	PRIIHNGGTL	48	157	PRIIPNGTTL	55
18	VRIIPNGGTL	64	88	PRIIINGGTL	42	158	PRIIPNGVTL	47
19	WRIIPNGGTL	42	89	PRIIKNGGTL	50	159	PRIIPNGWTL	52
20	YRIIPNGGTL	47	90	PRIILNGGTL	43	160	PRIIPNGYTL	64
21	PAIIPNGGTL	0	91	PRIIMNGGTL	54	161	PRIIPNGGAL	53
22	PCIIPNGGTL	0	92	PRIINNGGTL	45	162	PRIIPNGGCL	42
23	PDIIPNGGTL	0	93	PRIIPNGGTL	62	163	PRIIPNGGDL	0
24	PEIIPNGGTL	0	94	PRIIQNGGTL	60	164	PRIIPNGGEL	0
25	PFIIPNGGTL	0	95	PRIIRNGGTL	73	165	PRIIPNGGFL	68
26	PGIIPNGGTL	0	96	PRIISNGGTL	52	166	PRIIPNGGGL	47
27	PHIIPNGGTL	0	97	PRIITNGGTL	67	167	PRIIPNGGHL	35
28	PIIIPNGGTL	0	98	PRIIVNGGTL	56	168	PRIIPNGGIL	64
29	PKIIPNGGTL	76	99	PRIIWNGGTL	52	169	PRIIPNGGKL	57
30	PLIIPNGGTL	0	100	PRIIYNGGTL	60	170	PRIIPNGGLL	67
31	PMIIPNGGTL	0	101	PRIIPAGGTL	87	171	PRIIPNGGML	70
32	PNIIPNGGTL	0	102	PRIIPCNGTL	64	172	PRIIPNGGNL	56
33	PPIIPNGGTL	0	103	PRIIPDGGTL	42	173	PRIIPNGGPL	76
34	PQIIPNGGTL	0	104	PRIIPEGGTL	29	174	PRIIPNGGQL	69
35	PRIIPNGGTL	53	105	PRIIPFGGTL	59	175	PRIIPNGGRL	97
36	PSIIPNGGTL	0	106	PRIIPGGGTL	60	176	PRIIPNGGSL	80
37	PTIIPNGGTL	0	107	PRIIPHGGTL	49	177	PRIIPNGGTL	70
38	PVIIPNGGTL	0	108	PRIIPIGGTL	53	178	PRIIPNGGVL	85
39	PWIIPNGGTL	28	109	PRIIPKGGTL	69	179	PRIIPNGGWL	79
40	PYIIPNGGTL	23	110	PRIIPLGGTL	55	180	PRIIPNGGYL	73
41	PRAIPNGGTL	67	111	PRIIPMGGTL	57	181	PRIIPNGGTA	77
42	PRCIPNGGTL	65	112	PRIIPNGGTL	56	182	PRIIPNGGTC	63
43	PRDIPNGGTL	32	113	PRIIPPGGTL	43	183	PRIIPNGGTD	38
44	PREIPNGGTL	31	114	PRIIPQGGTL	69	184	PRIIPNGGTE	31
45	PRFIPNGGTL	70	115	PRIIPRGGTL	78	185	PRIIPNGGTF	75
46	PRGIPNGGTL	60	116	PRIIPSGGTL	58	186	PRIIPNGGTG	62
47	PRHIPNGGTL	73	117	PRIIPTGGTL	70	187	PRIIPNGGTH	34
48	PRIIPNGGTL	68	118	PRIIPVGGTL	61	188	PRIIPNGGTI	55
49	PRKIPNGGTL	83	119	PRIIPWGGTL	58	189	PRIIPNGGTK	74
50	PRLIPNGGTL	69	120	PRIIPYGGTL	66	190	PRIIPNGGTL	57
51	PRMIPNGGTL	100	121	PRIIPNAGTL	56	191	PRIIPNGGTM	53
52	PRNIPNGGTL	76	122	PRIIPNCGTL	52	192	PRIIPNGGTN	64
53	PRPIPNGGTL	65	123	PRIIPNDGTL	24	193	PRIIPNGGTP	63
54	PRQIPNGGTL	73	124	PRIIPNEGTL	30	194	PRIIPNGGTQ	64
55	PRRIPNGGTL	69	125	PRIIPNFGTL	64	195	PRIIPNGGTR	79
56	PRSIPNGGTL	82	126	PRIIPNGGTL	81	196	PRIIPNGGTS	62
57	PRTIPNGGTL	71	127	PRIIPNHGTL	61	197	PRIIPNGGTT	50
58	PRVIPNGGTL	71	128	PRIIPNIGTL	63	198	PRIIPNGGTV	62
59	PRWIPNGGTL	58	129	PRIIPNKGTL	62	199	PRIIPNGGTW	65
60	PRYIPNGGTL	69	130	PRIIPNLGTL	64	200	PRIIPNGGTY	57
61	PRIAPNGGTL	60	131	PRIIPNMGTL	68			
62	PRICPNGGTL	37	132	PRIIPNNGTL	71			
63	PRIDPNGGTL	0	133	PRIIPNPGTL	62			
64	PRIEPNGGTL	0	134	PRIIPNQGTL	60			
65	PRIFPNGGTL	72	135	PRIIPNRGTL	77			
66	PRIGPNGGTL	85	136	PRIIPNSGTL	58			
67	PRIHPNGGTL	52	137	PRIIPNTGTL	52			
68	PRIIPNGGTL	69	138	PRIIPNVGTL	53			
69	PRIKPNGGTL	71	139	PRIIPNWGTL	45			
70	PRILPNGGTL	61	140	PRIIPNYGTL	63			

Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 134	Intensität (%)	Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 134	Intensität (%)	Spot Nr.	Spot-Membran Abb. 134	Intensität (%)
1	AAPEKLALRN	67	71	NAPMKLALRN	59	141	NAPEKLALAN	46
2	CAPEKLALRN	43	72	NAPNKLALRN	45	142	NAPEKLALCN	22
3	DAPEKLALRN	24	73	NAPPKLALRN	49	143	NAPEKLALDN	0
4	EAPEKLALRN	29	74	NAPQKLALRN	54	144	NAPEKLALEN	0
5	FAPEKLALRN	67	75	NAPRKLALRN	58	145	NAPEKLALFN	48
6	GAPEKLALRN	79	76	NAPSKLALRN	44	146	NAPEKLALGN	43
7	HAPEKLALRN	47	77	NAPTKLALRN	45	147	NAPEKLALHN	27
8	IAPEKLALRN	49	78	NAPVKLALRN	68	148	NAPEKLALIN	34
9	KAPEKLALRN	77	79	NAPWKLALRN	46	149	NAPEKLALKN	84
10	LAPEKLALRN	53	80	NAPYKLALRN	43	150	NAPEKLALLN	31
11	MAPEKLALRN	38	81	NAPEALALRN	0	151	NAPEKLALMN	61
12	NAPEKLALRN	41	82	NAPECLALRN	0	152	NAPEKLALNN	55
13	PAPEKLALRN	48	83	NAPEDLALRN	0	153	NAPEKLALPN	47
14	QAPEKLALRN	45	84	NAPEELALRN	0	154	NAPEKLALQN	55
15	RAPEKLALRN	56	85	NAPEFLALRN	14	155	NAPEKLALRN	50
16	SAPEKLALRN	50	86	NAPEGLALRN	0	156	NAPEKLALSN	55
17	TAPEKLALRN	42	87	NAPEHLALRN	14	157	NAPEKLALTN	54
18	VAPEKLALRN	45	88	NAPEILALRN	0	158	NAPEKLALVN	43
19	WAPEKLALRN	41	89	NAPEKLALRN	41	159	NAPEKLALWN	49
20	YAPEKLALRN	57	90	NAPELLALRN	0	160	NAPEKLALYN	52
21	NAPEKLALRN	42	91	NAPEMLALRN	13	161	NAPEKLALAN	0
22	NCPEKLALRN	32	92	NAPENLALRN	12	162	NAPEKLALCN	0
23	NDPEKLALRN	24	93	NAPEPLALRN	0	163	NAPEKLALDN	0
24	NEPEKLALRN	32	94	NAPEQLALRN	0	164	NAPEKLALEN	0
25	NFPEKLALRN	44	95	NAPERLALRN	30	165	NAPEKLALFN	0
26	NGPEKLALRN	69	96	NAPESLALRN	0	166	NAPEKLALGN	0
27	NHPEKLALRN	87	97	NAPETLALRN	0	167	NAPEKLALHN	0
28	NIPEKLALRN	48	98	NAPEVLALRN	0	168	NAPEKLALIN	0
29	NKPEKLALRN	90	99	NAPEWLALRN	0	169	NAPEKLALKN	37
30	NLPEKLALRN	52	100	NAPEYLALRN	0	170	NAPEKLALLN	0
31	NMPEKLALRN	44	101	NAPEKLALRN	60	171	NAPEKLALMN	0
32	NNPEKLALRN	50	102	NAPEKLCALRN	35	172	NAPEKLALNN	0
33	NPPEKLALRN	39	103	NAPEKLDALRN	0	173	NAPEKLALPN	0
34	NQPEKLALRN	47	104	NAPEKLEALRN	0	174	NAPEKLALQN	0
35	NRPEKLALRN	59	105	NAPEKLFALRN	51	175	NAPEKLALRN	36
36	NSPEKLALRN	44	106	NAPEKLGALRN	54	176	NAPEKLALSN	0
37	NTPEKLALRN	35	107	NAPEKLHALRN	45	177	NAPEKLALTN	0
38	NVPEKLALRN	38	108	NAPEKLIALRN	47	178	NAPEKLALVN	0
39	NWPEKLALRN	38	109	NAPEKLLALRN	100	179	NAPEKLALWN	0
40	NYPEKLALRN	41	110	NAPEKLLALRN	51	180	NAPEKLALYN	0
41	NAAEKLALRN	44	111	NAPEKLMALRN	39	181	NAPEKLALRA	59
42	NACEKLALRN	30	112	NAPEKLNALRN	53	182	NAPEKLALRC	27
43	NADEKLALRN	0	113	NAPEKLPLRN	38	183	NAPEKLALRD	0
44	NAEEKLALRN	0	114	NAPEKLQALRN	36	184	NAPEKLALRE	0
45	NAFEKLALRN	44	115	NAPEKLRALRN	45	185	NAPEKLALRF	55
46	NAGEKLALRN	43	116	NAPEKLSALRN	53	186	NAPEKLALRG	48
47	NAHEKLALRN	32	117	NAPEKLTALRN	39	187	NAPEKLALRH	25
48	NAIEKLALRN	38	118	NAPEKLVALRN	35	188	NAPEKLALRI	44
49	NAKEKLALRN	63	119	NAPEKLWALRN	47	189	NAPEKLALRK	68
50	NALEKLALRN	40	120	NAPEKLYALRN	51	190	NAPEKLALRL	38
51	NAMEKLALRN	45	121	NAPEKLAARN	45	191	NAPEKLALRM	42
52	NANEKLALRN	52	122	NAPEKLACRN	21	192	NAPEKLALRN	39
53	NAPEKLALRN	54	123	NAPEKLADRN	0	193	NAPEKLALRP	36
54	NAQEKLALRN	41	124	NAPEKLAERN	0	194	NAPEKLALRQ	55
55	NAREKLALRN	33	125	NAPEKLAFRN	42	195	NAPEKLALRR	48
56	NASEKLALRN	43	126	NAPEKLALGN	62	196	NAPEKLALRS	49
57	NATEKLALRN	41	127	NAPEKLAHRN	50	197	NAPEKLALRT	37
58	NAVEKLALRN	41	128	NAPEKLAIRN	47	198	NAPEKLALRV	36
59	NAWEKLALRN	39	129	NAPEKLAKRN	89	199	NAPEKLALRW	36
60	NAYEKLALRN	49	130	NAPEKLALRN	55	200	NAPEKLALRY	47
61	NAPAKLALRN	48	131	NAPEKLAMRN	37			
62	NAPCKLALRN	45	132	NAPEKLANRN	55			
63	NAPDKLALRN	48	133	NAPEKLAPRN	48			
64	NAPEKLALRN	39	134	NAPEKLAQRN	41			
65	NAPFKLALRN	43	135	NAPEKLARRN	58			
66	NAPGKLALRN	49	136	NAPEKLASRN	51			
67	NAPHKLALRN	43	137	NAPEKLATRN	30			
68	NAPIKLALRN	51	138	NAPEKLAVRN	41			
69	NAPKKLALRN	72	139	NAPEKLAWRN	34			
70	NAPKLALRN	55	140	NAPEKLAYRN	53			

**3. Abkürzungsverzeichnis**

AGE	Agarose-Gel-Elektrophorese
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
$\alpha_2$ -M	$\alpha_2$ -Makroglobulin
AP	Alkalische Phosphatase
As	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ci	Curi
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
$\Delta$	Synonym für deletiert
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescent activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAS	Gruppe A Streptokokken
GRAB	Protein <u>G</u> Related $\alpha_2$ -M <u>B</u> inding Protein
GST	Gluthation-S Transferase
h	Stunde
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

---

Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Milli
mA	Milliamper
MHC	Major Histocompatibility Complex
μ	Mikro
min	Minuten
n	Nano
OD	Optische Dichte
P	Wahrscheinlichkeit
p	Pico
p.a.	Pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Chain Reaction
pK <sub>I</sub>	Dissoziationskonstante
PMNs	Polymorphkernige Granulocyten
PO	Peroxidase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.k.	Subkutan
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	Unit (1 U : Umsatz von 1 Mol Substrat/min)
UV	Ultraviolett
Ü/N-Kultur	Über-Nacht-Kultur
V	Volt
vol	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## VIII. Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung, Bereich Mikrobiologie der GBF Braunschweig durchgeführt.

Der *S. pyogenes* Wildtypstamm KTL3 und die Mutante MR4 wurden freundlicherweise von Dr. Magnus Rasmussen vom Institut für Zell- und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Pathogenese, Lund University, Lund, Schweden bereitgestellt. Für die Peptid Array-Synthese und hilfreiche Diskussionen danke ich Susanne Daenicke und Dr. Ronald Frank, GBF Braunschweig. Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. M. Rohde durchgeführt.

Für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit anfertigen zu können, sowie die Übernahme des Referats danke ich Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis und Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn der sich für die Übernahme des zweiten Referats bereiterklärt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Singh Chhatwal möchte ich mich für die Überlassung des Themas bedanken und die Möglichkeit meine Arbeit innerhalb der MPAT Gruppe durchzuführen.

Frau Dr. Eva Medina danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und Hilfestellung bei einer Vielzahl von Infektionsversuchen. Ohne Ihre Unterstützung, ermutigende Worte und häufige, mit viel Enthusiasmus geführte Diskussionen rund um den Streptokokkus wäre das letzte Jahr nur halb so schön gewesen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Priv. Doz. Dr. Sven Hammerschmidt für die Betreuung in molekularbiologischen Fragen und die gründliche Korrektur dieser Arbeit.

Bei Dorothea, Oliver, Inka, und Katrin möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima die vielen Diskussionen über Streptokokken, Infektionsmodelle und neue Methoden bedanken. Diese wurden äußerst sachlich, meistens bei einer Tasse frischen Kaffees (Danke Inka) geführt. Allen anderen MPAT Mitgliedern danke ich für eine insgesamt sehr schöne Zeit.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann Andreas danken, die mich immer ermutigt und unterstützt haben, wo sie nur konnten.